

DERWENT-ACC-NO: 1974-07762V

DERWENT-WEEK: 197405

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Bacteria identification - using electronic logic circuit to compare sample characteristics with standards

INVENTOR-NAME:

PRIORITY-DATA: 1972FR-0015163 (April 24, 1972)

PATENT-FAMILY:

| PUB-NO       | PUB-DATE         | LANGUAGE | PAGES | MAIN-IPC |
|--------------|------------------|----------|-------|----------|
| FR 2181543 A | January 11, 1974 | N/A      | 000   | N/A      |

INT-CL (IPC): C12K001/00

ABSTRACTED-PUB-NO: FR 2181543A

BASIC-ABSTRACT: Samples of bacteria to be identified are tested with a set of standard reagents so that an observer can visually classify certain identifying characteristics, each of which can be nominated as: specific positive, specific negative or uncertain. The "uncertain" results are discarded, and the specific results are keyed into an electronic logic circuit comprising a number of multi-input gates, each activated only by a predetermined combination of key signals which correspond to the identity of specific bacteria; this identification can be indicated by illumination of a diode when the gate is activated. Much faster identification of samples and elimination of laborious visual comparison checks.

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1<sup>re</sup> PUBLICATION

- ②2 Date de dépôt ..... 24 avril 1972, à 14 h 35 mn.  
④1 Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — «Listes» n. 49 du 7-12-1973.
- ⑤1 Classification internationale (Int. Cl.) C 12 k 1/00.
- ⑦1 Déposant : BOURGEAY Jean-Pierre, résidant en France.
- ⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1
- ⑦4 Mandataire : Jean Maisonnier, Ingénieur-Conseil.
- ⑤4 Appareil pour l'identification des bactéries par le moyen de séries normalisées de réaction.
- ⑦2 Invention de :
- ③3 ③2 ③1 Priorité conventionnelle :

La présente invention se réfère à l'identification des bactéries par le moyen de réactifs spécifiques, fournissant notamment une indication visible pour l'opérateur.

On sait que pour une telle identification l'on utilise très  
5 fréquemment une série de tubes renfermant certains réactifs déterminés. On ensemence ces tubes à l'aide d'une culture de la bactérie à identifier, on les maintient à température tiède pendant un temps suffisant, éventuellement en les protégeant de l'atmosphère par une couche supérieure d'huile inerte, puis on observe la coloration,  
10 par exemple, soit directement (le tube intéressé renfermant déjà un indicateur coloré), soit moyennant addition après coup d'un indicateur déterminé. Pour certains tubes l'indication peut d'ailleurs consister non pas en une coloration, mais bien en la formation d'un dépôt, d'un anneau, etc... De toute manière après le temps d'incuba-  
15 tion prévu, les divers tubes présentent ou ne présentent pas certains caractères faciles à relever à la vue et qui permettent de conclure qu'il s'est produit ou non certaines réactions particulières. En se basant sur l'ensemble des résultats ainsi obtenus pour une bactérie inconnue et en se reportant à un tableau convenable-  
20 ment établi, il est possible d'identifier au moins les bactéries le plus souvent rencontrées en mettant en oeuvre à cet effet un nombre limité de tubes, c'est-à-dire de réactions élémentaires.

Dans la réalité les choses sont plus compliquées. En effet les caractères qui permettent d'identifier les bactéries par le  
25 moyen d'une série de tubes normalisée peuvent être de trois types : certains sont importants en ce sens qu'ils présentent un haut degré de spécificité, d'autres au contraire sont douteux ou plus exactement non spécifiques parce qu'ils peuvent apparaître ou ne pas apparaître pour une même bactérie suivant les conditions opératoires,  
30 enfin certains autres sont intermédiaires en ce sens que s'ils sont en général spécifiques, donc assez importants, il peut leur arriver de façon plus ou moins fréquente de ne pas l'être. L'opérateur doit donc en fait suivre ligne par ligne le tableau des divers caractères et des bactéries qu'ils identifient, en prenant soin de se baser d'  
35 abord sur les caractères importants, puis sur les moins importants en négligeant ceux considérés comme douteux, le tout pour aboutir soit à une identification sûre, soit à la conclusion qu'il faut procéder à de nouveaux essais pour lever une incertitude résiduelle. Le moins qu'on puisse dire est que pareille consultation du tableau  
40 en fonction des résultats obtenus constitue un travail laborieux,

délicat et qui comporte de nombreux risques d'erreur.

On a cherché à réaliser un décodage automatique des résultats en affectant aux divers caractères un certain coefficient tenant compte du fait qu'ils sont importants, douteux ou intermédiaires.

5 Mais l'expérience a démontré qu'on n'arrivait pas à obtenir ainsi des conclusions suffisamment sûres et correctes.

L'invention vise à remédier à ces inconvénients et à permettre d'établir un appareil qui décharge l'opérateur de tout travail de repérage entre les diverses lignes d'un tableau et par conséquent  
10 de tout risque d'erreur.

Suivant l'invention, pour chaque bactérie envisagée, l'on divise en trois groupes les caractères relevés à la fin des essais, savoir :

- les caractères douteux ou qui ne présentent pas en gé-  
15 néral une spécificité suffisante pour qu'on puisse se baser sur eux en vue de l'identification sûre de la bactérie étudiée, ces caractères pouvant être positifs ou négatifs ;

- ceux des autres caractères (c'est-à-dire les caractères spécifiques importants et ceux généralement spécifiques, pour la  
20 bactérie étudiée) qui doivent donner un résultat positif, c'est-à-dire pour lesquels doit apparaître le phénomène visible attendu (changement de coloration, dépôt, etc...) ;

- et enfin ceux de ces autres caractères qui doivent donner au contraire un résultat négatif.

25 Et l'on établit des circuits électroniques qui, négligeant délibérément le premier groupe de caractères, ne tiennent compte que du second et du troisième, de manière telle que lorsqu'on leur envoie sans aucune distinction des tensions représentatives de l'état positif ou négatif des divers caractères des trois groupes, ils puis-  
30 sent répondre en identifiant la bactérie étudiée parmi celles pour lesquelles ils ont été prévus.

Les circuits électroniques peuvent notamment comprendre :

- des touches individuelles correspondant aux divers caractères susceptibles d'être relevés, chaque touche comportant une  
35 position de repos qui correspond au signe négatif du caractère auquel elle est affectée et une position de travail correspondant au signe positif de celui-ci ;

- un inverseur logique individuellement associé à chaque  
touche ;

40 - un premier conducteur partant directement de chaque tou-

che pour transmettre un signal d'un signe déterminé, par ex mple positif, quand celle-ci est à la position de travail ;

- un second conducteur partant de chaque inverseur pour transmettre un signal de ce même signe quand la touche correspondante est à la position de repos ;

- des portes électroniques dont les entrées sont reliées aux conducteurs précités de façon telle que chaque porte ou groupe de portes réponde lorsque les signaux qu'il reçoit correspondent à la combinaison de caractères du second et du troisième groupe qui identifie une bactérie parmi celles envisagées ;

- et des moyens de signalisation de la réponse de la porte ou du groupe de portes correspondant à chaque bactérie.

Suivant une autre caractéristique de l'invention, en vue de réaliser une simplification considérable de l'appareillage électrique, on distingue parmi les caractères positifs et/ou négatifs du second et du troisième groupe certains ensembles qui se retrouvent inchangés pour plusieurs bactéries, on affecte une ou plusieurs portes à cet ensemble pour une seule des bactéries précitées et l'on renvoie la sortie de cette ou de ces portes à l'entrée de l'une des portes des autres bactéries comportant le même ensemble de caractères.

Le dessin annexé, donné à titre d'exemple, permettra de mieux comprendre l'invention, les caractéristiques qu'elle présente et les avantages qu'elle est susceptible de procurer :

Fig. 1 reproduit partiellement un tableau utilisé dans la pratique pour l'identification de diverses bactéries à l'aide de réactions normalisées.

Fig. 2 est un schéma montrant les circuits électroniques utilisés par application de l'invention pour réaliser cette identification de façon automatique.

On a représenté en fig. 1 un tableau de dix caractères a à j propres à permettre d'identifier quatre genres de bactéries A à D. Il doit être entendu que dans la réalité le nombre des caractères peut être beaucoup plus grand, de même d'ailleurs que celui des bactéries envisagées. Les signes utilisés dans le tableau de fig. 1 sont ceux qu'on peut trouver sur le tableau dit Vixotab de l'Institut Pasteur de Lyon. Les signes + et - cerclés correspondent aux caractères importants positifs et négatifs. Les signes + et - non cerclés correspondent de leur côté aux signes encore importants, mais non spécifiques. Le double signe + indique des caractères le

plus souvent positifs, mais qui peuvent rester négatifs. Quant à la lettre d elle signale les caractères douteux communs à plusieurs bactéries et qu'on ne doit donc considérer qu'avec circonspection. On conçoit aisément que cette multiplicité de qualifications rend  
5 assez laborieuse l'interprétation des résultats d'un essai.

Conformément à l'invention, pour chaque bactérie envisagée l'on néglige délibérément les indications d en se limitant donc aux + et - cerclés ou non. En d'autres termes pour chaque bactérie l'on divise les caractères en trois groupes, savoir les incertains (d),  
10 les suffisamment spécifiques positifs et les suffisamment spécifiques négatifs, le premier groupe étant laissé de côté.

Dans le schéma de fig. 2 l'on a représenté dix touches 1a à 1j qui correspondent aux dix caractères prévus sur le tableau. Il est convenu qu'une touche levée correspond à un caractère négatif  
15 et une touche abaissée à un caractère positif. Du contact fixe de chaque touche part un premier conducteur ou conducteur direct 2a à 2j relié à la masse à travers une forte résistance de décharge 3a à 3j, étant entendu que la masse représente le pôle négatif tandis que l'organe mobile de la touche considérée est relié au pôle posi-  
20 tif. Le contact fixe de chaque touche est d'autre part relié à un inverseur 4a à 4j duquel part un second conducteur ou conducteur inversé 5a à 5j qui est donc positif quand la touche est levée et négatif quand elle est enfoncée. Les conducteurs 2a-2j et 5a-5j constituent les barreaux horizontaux d'une grille. De certains de  
25 ces barreaux horizontaux partent des conducteurs ou barreaux verticaux qui aboutissent à des systèmes de portes dont les sorties représentent les bactéries.

C'est ainsi que des dix conducteurs ou barreaux inversés 5a à 5j partent des conducteurs 6A qui aboutissent aux dix entrées d'une  
30 porte 7A de type NET, la sortie de cette porte étant reliée au pôle positif à travers une diode électro-luminescente 8A et une résistance 9A. On voit aisément que si les dix touches 1a à 1j sont à la position levée, les dix conducteurs 6A sont positifs et par suite la sortie de la porte 7A est négative, ce qui provoque l'allumage de la  
35 diode 8A. Or l'état levé des dix touches correspond à l'état négatif des dix caractères du tableau de fig. 1, c'est-à-dire à la ligne horizontale qui représente la bactérie A. Pour tout autre état des touches l'un au moins des conducteurs 5a à 5j est négatif, de sorte que la porte 7A donne une sortie positive n'allumant pas la diode.  
40 L'allumage de 8A signale donc que la bactérie recherchée est celle

A.

Si l'on veut voir les choses sous l'angle algébrique, on peut écrire pour la diode 8A qui représente la bactérie A :

$$A = \bar{a} \bar{b} \bar{c} \bar{d} \bar{e} \bar{f} \bar{g} \bar{h} \bar{i} \bar{j} \quad (1)$$

- 5 La diode s'allume si la sortie de 7A est positive, c'est-à-dire si  $\bar{A} = 0$ , ce qui correspond bien à  $A = 1$ .

Pour la bactérie B, le tableau de fig. 1 indique deux caractères  $\bar{d}$  et un caractère  $\bar{e}$  qu'on néglige. On pourrait donc écrire :

$$B = \bar{a} \bar{d} \bar{e} \bar{f} \bar{g} \bar{h} \bar{i} \quad (2)$$

- 10 Mais on remarque que pour les caractères  $\bar{d}$  et  $\bar{e}$  les signes sont les mêmes qu'en ce qui concerne la bactérie C. On se trouve donc en présence d'un ensemble commun à deux bactéries et qu'on peut désigner du nom de  $\alpha$ . On écrira donc :

$$B = \alpha (\bar{a} \bar{f} \bar{g} \bar{h} \bar{i}) \quad (3)$$

- 15 avec  $\alpha = \bar{d} \bar{e}$  (4)

Pour représenter la parenthèse on prévoit une première porte NET 7B1 dont les entrées sont respectivement reliées par des conducteurs 6B aux barreaux 5a, 5f, 5g, 2h et 2i. D'autre part, pour représenter  $\alpha$  l'on a prévu une seconde porte NET 7B2 que d'autres conducteurs 6B relient aux barreaux 2d et 5e. A la sortie de chacune de ces portes 7B1 et 7B2 est associé un inverseur 10B1, 10B2. Les sorties de ces deux inverseurs sont reliées aux entrées d'une troisième porte 7B3 et c'est la sortie de cette dernière qui alimente la diode électroluminescente 8B à laquelle est là encore associée une résistance 9B.

Il est facile de constater que l'ensemble des trois portes 7B<sub>1</sub>, 7B<sub>2</sub>, 7B<sub>3</sub> avec les inverseurs intermédiaires 10B<sub>1</sub> et 10B<sub>2</sub> fonctionne exactement comme la porte unique 7A pour la bactérie A, c'est-à-dire que lorsque l'égalité (2) est satisfaite, la diode 8B s'allume pour signaler que les résultats relevés correspondent à la bactérie B. Mais on remarquera que la sortie de l'inverseur 10B<sub>2</sub> représente à la condition  $\alpha = \bar{d} \bar{e}$ . En d'autres termes, lorsque l'égalité (4) est satisfaite, la sortie de 10B<sub>2</sub> est positive, alors qu'elle est autrement négative.

35 En ce qui concerne maintenant la bactérie C, on retrouve sur la ligne correspondante du tableau l'ensemble  $\alpha$  précité, mais on remarque en outre sur cette même ligne que les trois caractères  $\bar{g} \bar{h} \bar{i}$  sont de même signe pour cette bactérie et pour la bactérie D. Il est donc là encore possible de faire apparaître simplement cet ensemble.

40 En d'autres termes, on peut écrire :

$$C = a \bar{b} c d \bar{e} f g \bar{h} i j \quad (5)$$

ou

$$C = \alpha (a \bar{b} c f g \bar{h} i j) \quad (6)$$

ou enfin

$$5 \quad C = \alpha \beta (a \bar{b} c f g j) \quad (7)$$

$$\text{avec } \beta = g \bar{h} i \quad (8)$$

En ce qui concerne  $\alpha$ , on le prélève à partir de la sortie de l'inverseur  $10B_2$  par le moyen d'un conducteur 11 qu'on amène à l'une des entrées d'une porte NET  $7C_1$ , les autres entrées de cette porte 10 étant reliées aux barreaux respectifs  $2a$ ,  $5b$ ,  $2c$ ,  $2f$ ,  $2j$ . Il est d'autre part prévu une seconde porte  $7C_2$ , également de type NET, dont les entrées sont reliées aux barreaux  $2g$ ,  $5h$ , et  $2i$ . A la sortie de chacune de ces deux portes  $7C_1$ ,  $7C_2$  est associé un inverseur  $11C_1$ ,  $11C_2$  et les sorties de ces deux inverseurs arrivent à une troisième 15 porte NET  $7C_3$  qui alimente une diode électro-luminescente 8C montée en série avec une résistance 9C.

Il est facile de voir que là encore les deux portes  $7C_1$  et  $7C_2$ , les deux inverseurs  $11C_1$  et  $11C_2$  et la troisième porte  $7C_3$  fonctionnent comme une porte unique qui remplit bien la condition prévue.

20 Mais la sortie de l'inverseur  $11C_2$  représente la condition :

$$\beta = g \bar{h} i \quad (9)$$

Enfin pour la quatrième bactérie D la condition à réaliser est

$$D = c e f g \bar{h} i \quad (10)$$

ou

$$25 \quad D = \beta (c e f) \quad (11)$$

Il suffit donc de faire correspondre à cette bactérie D une porte NET unique 7D à quatre entrées, la première étant reliée par un conducteur 12 à la sortie de l'inverseur  $11C_2$  pour amener la condition  $\beta$ , tandis que les trois autres sont respectivement reliés 30 aux barreaux  $2c$ ,  $2e$  et  $2f$ .

Là encore à la porte 7D sont associées une diode électro-luminescente 8D et une résistance 9D.

On comprend qu'on pourrait multiplier le nombre des bactéries en même temps que celui des caractères, toujours en faisant ressortir, dans la mesure du possible, des ensembles de caractères communs 35 à plusieurs bactéries en ce qui concerne leur signe et leur importance, ces ensembles étant matérialisés pour l'une seulement des bactéries qui comporte chacun d'eux de manière à ce qu'il suffise d'envoyer aux portes des autres un signal unique représentant tout 40 l'ensemble de caractères envisagé.



L'utilisation de l'appareil se comprend aisément:

L'opérateur lit sur ses tubes les résultats individuels de l'essai, sans avoir à se préoccuper de l'importance des caractères. Si un tube donne un résultat positif, il appuie la touche ; si le résultat  
5 est négatif (absence du phénomène visible attendu), il laisse la touche levée. A la fin de la manipulation du clavier, si une diode s'allume c'est que la préparation étudiée renferme la bactérie à laquelle cette diode correspond. Si aucune diode ne s'allume, alors il y a doute et les essais doivent être repris pour que l'on sache  
10 si la bactérie présente dans la culture n'est pas prévue par la méthode ou si l'échec provient de conditions expérimentales défectueuses. Il est à noter que l'examen du tableau d'identification qui conduit à l'établissement du schéma logique doit être mené de telle manière de l'allumage simultané de deux diodes soit impossible.  
15 ble.

Il doit d'ailleurs être entendu que la description qui précède n'a été donnée qu'à titre d'exemple et qu'elle ne limite nullement le domaine de l'invention dont on ne sortirait pas en remplaçant les détails d'exécution décrits par tous autres équivalents.

20 On comprend notamment que les portes NET peuvent être remplacées par des portes ET ; il suffirait de réaliser un schéma logique différent, mais correspondant aux mêmes équations booléennes. Les diodes électro-luminescentes pourraient être remplacées par des relais électroniques ou électro-magnétiques actionnant des circuits  
25 avertisseurs appropriés.

## R E V E N D I C A T I O N S

1. Procédé pour faciliter l'identification des bactéries à l'aide d'essais effectués par le moyen d'une série normalisée de réactions, par exemple à l'aide de systèmes à tubes multiples, avec apparition de phénomènes visibles par coloration ou autrement, chacun de ceux-ci constituant un caractère positif ou négatif suivant que le phénomène apparaît ou n'apparaît pas, caractérisé en ce qu'on divise en trois groupes les caractères relevés à la fin des essais, savoir :

- les caractères douteux ou qui ne présentent pas en général une spécification suffisante pour qu'on puisse se baser sur eux en vue de l'identification sûre de la bactérie étudiée, ces caractères pouvant être positifs ou négatifs ;
- ceux des autres caractères (c'est-à-dire les caractères spécifiques importants et ceux généralement spécifiques) qui, pour la bactérie étudiée, doivent donner un résultat positif, c'est-à-dire pour lesquels doit apparaître le phénomène visible attendu ;
- et enfin ceux de ces autres caractères qui doivent donner au contraire un résultat négatif ;

et l'on établit des circuits électroniques qui, négligeant délibérément le premier groupe de caractères, ne tiennent compte que du second et du troisième, de manière telle que lorsqu'on leur envoie sans aucune distinction des tensions représentatives de l'état positif ou négatif des divers caractères des trois groupes, ils puissent répondre en identifiant la bactérie étudiée parmi celles pour lesquelles ils ont été prévus.

2. Appareil à circuits électroniques pour la mise en oeuvre du procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la combinaison des éléments suivants dont certains au moins sont connus :

- des touches individuelles correspondant aux divers caractères susceptibles d'être relevés pour les diverses bactéries envisagées, chaque touche comportant une position de repos qui correspond à l'un des deux signes possibles du caractère auquel elle est affectée et une position de travail correspondant à l'autre signe possible de celle-ci ;
- un inverseur logique individuellement associé à chaque touche ;
- un premier conducteur partant directement du contact de

chaque touche pour transmettre un signal d'un signe donné quand celle-ci est abaissée ;

- un second conducteur partant de chaque inverseur pour transmettre un signal de ce même signe quand la touche correspondante est levée ;

- des portes électroniques dont les entrées sont sélectivement reliées à certains des conducteurs précités de façon telle que chaque porte ou groupe de portes réponde lorsque les signaux qu'il reçoit correspondent à la combinaison de caractères du second et du

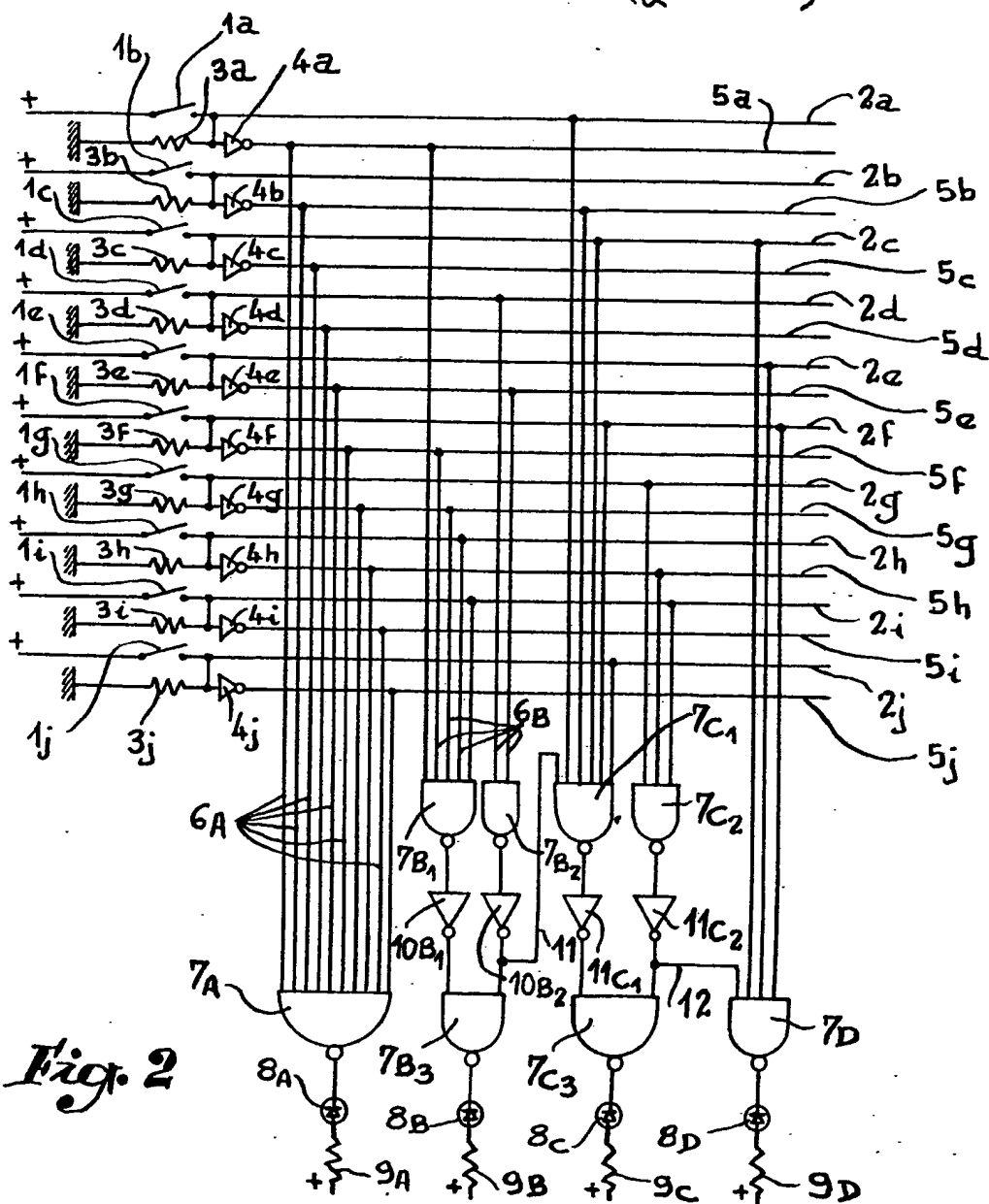
troisième groupe qui identifie une bactérie parmi celles envisagées ;  
- et des moyens de signalisation de la réponse de la porte ou du groupe de portes correspondant à chaque bactérie.

3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'on groupe en ensembles les caractères du deuxième et du troisième groupe qui sont communs à plusieurs bactéries, et en ce qu'on traite cet ensemble comme un caractère unique pour certaines au moins des bactéries précitées.

4. Appareil pour la mise en oeuvre du procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comprend, pour l'une des bactéries comportant un ensemble de caractères du second et du troisième groupe commun à plusieurs de celles-ci, une porte ou groupe de portes qui reçoit les signaux correspondant à ces caractères de manière à faire apparaître un signal de sortie représentatif de la présence ou de l'absence de celui-ci, ce signal étant envoyé à l'entrée de l'une des portes qui correspondent aux autres bactéries auxquelles l'ensemble de caractères précité est commun, de manière à réduire le nombre d'entrées et l'importance de la câblerie pour ces bactéries.

*Fig. 1*

|   | a | b         | c        | d        | e | f         | g        | h         | i | j     |
|---|---|-----------|----------|----------|---|-----------|----------|-----------|---|-------|
| A | - | $\ominus$ | -        | -        | - | $\ominus$ | -        | -         | - | -     |
| B | - | d         | d        | $\oplus$ | - | -         | -        | +         | + | $\pm$ |
| C | + | -         | +        | +        | - | +         | $\oplus$ | $\ominus$ | + | +     |
| D | d | $\pm$     | $\oplus$ | d        | + | $\oplus$  | +        | -         | + | d     |

*Fig. 2*

DERWENT-ACC-NO: 1986-151806

DERWENT-WEEK: 198624

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Automatic analysis of biological samples esp. blood or milk - by  
pattern recognition of grid backed video records of microscope images

INVENTOR-NAME: BRULE, P; EMELINA, R ; GRAC, I ; LEGOFF, D ; PALIX, D

PRIORITY-DATA: 1984FR-0016781 (October 31, 1984) , 1983FR-0018936 (November  
28,

1983)

PATENT-FAMILY:

| PUB-NO       | PUB-DATE    | LANGUAGE | PAGES | MAIN-IPC |
|--------------|-------------|----------|-------|----------|
| FR 2572528 A | May 2, 1986 | N/A      | 010   | N/A      |

INT-CL (IPC): G01N015/00; G01N033/04

ABSTRACTED-PUB-NO: FR 2572528A

BASIC-ABSTRACT: Process for the identification, sorting and counting of  
microscopic particles, partic. micro-organisms of animal or vegetable origin  
includes the following sequential stages:-(1) samples are prepd. continuously  
and deposited in succession upon an advancing conveyor surface. The conveyor  
surface moves the samples into the field of view of a microscope providing  
images which are recorded by a video camera. (2) the recorded images are set  
against a squared pattern grid so that the image corresp. to each sample can be  
analysed according to pattern recognition techniques. (3) The results of the  
analyses are subjected to statistical processing from which digital results are  
displayed and/or printed for the operator.

Sample prepn. may include specific colouring. Samples can be deposited on to  
the conveying surface by continuous spraying or blowing.

USE/ADVANTAGE - Analysis of bacteria in milk or blood analysis in research of  
parasites, esp. malaria parasites. The process being completely automated  
eliminates human errors which can account for more than 20% inaccuracies when  
laborious research is undertaken including thousands of samples.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
—  
PARIS  
—

①1 N° de publication : **2 572 528**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **84 16781**

⑤1 Int Cl<sup>4</sup> : G 01 N 15/00, 33/04, 33/48.

⑫ **DEMANDE DE CERTIFICAT D'ADDITION  
À UN BREVET D'INVENTION**

**A2**

②2 Date de dépôt : 31 octobre 1984.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 18 du 2 mai 1986.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés : 1<sup>re</sup> addition au brevet 83 18936 pris le 28 no-  
vembre 1983.

⑦1 Demandeur(s) : *SOCIETE INTER INFORMATIQUE (SII)*  
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : Pierre Brule, Richard Emelina, Denis Le  
Goff, Didier Palix et Ivan Grac.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Arbousse-Bastide.

⑤4 Procédé et dispositif d'analyse automatique d'échantillons biologiques.

⑤7 Procédé pour l'identification, le tri et le comptage conti-  
nus et automatiques de particules de petites dimensions, selon  
la revendication 1 du brevet principal, caractérisé en ce qu'il  
consiste, dans une première opération, à préparer et déposer  
de manière continue une succession d'échantillons sur un  
support en déplacement continu, en les répartissant sur le  
trajet d'exploration d'un système d'enregistrement par une  
caméra vidéo des images de ces échantillons données par un  
microscope, dans une seconde opération, à procéder audit  
enregistrement, dans une troisième opération à décomposer  
l'image de chaque échantillon suivant un découpage quadrillé  
en vue, dans une quatrième opération de l'analyse de ladite  
image conformément aux techniques dites de « pattern reco-  
gnition », et enfin à traiter statistiquement les résultats de  
cette analyse, à les digitaliser et à les délivrer matériellement à  
l'opérateur.

**FR 2 572 528 - A2**

La présent Certificat d'Addition concerne des précisions apportées à la mise en oeuvre du procédé décrit au Brevet Principal, ce procédé ayant pour objet l'identification, le tri et le comptage entièrement automatiques de particules de très petites dimensions et notamment mais non exclusivement des micro-organismes d'origine animale ou végétale, ainsi que l'exploitation des résultats obtenus dans des domaines aussi variés que les analyses biologiques obtenus dans des domaines aussi variés que les analyses biologiques telles que celles du lait ou du sang, les contrôles automatiques de pollution bactérienne, par exemple dans le pilotage automatique des stations d'épuration d'effluents industriels ou d'eau potable, ce procédé se caractérisant par sa précision, sa rapidité et son bon marché.

Ainsi qu'il a été indiqué au Brevet Principal, divers procédés visant à atteindre des résultats semblables sont connus. Par exemple, dans le cas de l'analyse du sang humain, le processus usuel consiste dans un premier temps à préparer manuellement chaque échantillon par divers traitements mécaniques et/ou chimiques, puis à l'examiner au microscope de manière à analyser et compter les divers éléments cellulaires recherchés. Cette technique est longue et laborieuse et comporte cependant un taux d'erreur admis entre 20 et 30 %.

De même, pour analyser et compter les bactéries présentes dans un liquide, l'opérateur doit prélever des échantillons du liquide, puis procéder sur chacun à des cultures permettant de faire apparaître les bactéries, ce qui provoque des délais de plusieurs heures, et enfin analyser et compter ces bactéries par référence à des formes connues, avec les mêmes limitations et inconvénients que ci-dessus.

Plus généralement, il n'existe pas de procédé automatique et répétitif permettant d'obtenir les résultats cherchés de manière rapide et continue, tout en évitant l'erreur humaine.

L'invention permet d'atteindre ce résultat par la mise en oeuvre d'une succession d'opérations dont le principe est individuellement connu pour d'autres applications, mais qui sont ici combinées et adaptées l'une à l'autre en vue de ce nouveau résultat, ces opérations étant énumérées au Brevet Principal :

La première opération consiste à préparer et à déposer de manière automatique et continue une succession d'échantillons sur un support continu, en les répartissant sur un trajet d'explo-

ration d'un système d'enregistrement de tous les échantillons successifs par une caméra vidéo .

5 La seconde opération consiste dans ledit enregistrement par la caméra vidéo de l'image donnée par un microscope, comportant des éléments optiques particuliers.

La troisième opération consiste dans la décomposition de l'image de chaque échantillon suivant un découpage quadrillé comportant un certain nombre de lignes et colonnes, définissant pour chaque échantillon un certain nombre de zones bien identifiées ou "pixels", en vue de l'analyse de chaque échantillon conformément à des techniques classiques en elles-mêmes.

10 La quatrième opération consiste dans ladite analyse d'image en fonction du niveau d'éclairement de chaque pixel, au moyen d'un ordinateur, dont les résultats d'analyse sur tous les échantillons sont traités statistiquement puis digitalisés sur imprimante, ce qui permet, non seulement de connaître à tout moment le résultat de l'analyse, mais au surplus de suivre avec le temps l'évolution de ce résultat.

15 La mise en oeuvre de ces diverses opérations appelle toutefois un certain nombre de commentaires, qui font l'objet de cet Additif :

Commentaires sur la première opération :

20 Chaque échantillon subit une préparation physico-chimique, en amont de la phase de dépôt sur le support. Cette préparation est comparable aux traitements usuels pour le produit considéré, mais moyennant certaines modifications.

25 Ainsi dans les techniques antérieures, par exemple la phase de "coloration" n'avait pour but que de rendre visibles toute une catégorie de cellules telles que les bactéries, sans préjuger de leur état de développement ou de mort. Selon la présente invention, la coloration a pour but d'indiquer l'état viable de certaines cellules et de les visualiser sans colorer les artefacts.

30 De même, après la coloration, l'application d'un traitement d'épifluorescence (en général en rayonnement UV par dessus), dont la ré-émission est filtrée permet la mise en évidence de toutes les cellules contenant un noyau, tandis qu'un traitement d'immunofluorescence permet de les extraire de façon spécifique.

35 Enfin, chaque échantillon est déposé automatiquement

40



par pulvérisation, ou par soufflage sur le support continu, sous forme de gouttes calibrées d'épaisseur et de diamètre constants. Ces gouttes sont réparties de façon régulière et homogène sur le support, pour être vues successivement par la caméra. Dans une première réalisation, le support est un disque horizontal tournant  
5 autour de son axe, et les gouttes sont déposées en cercles concentriques, de manière à être explorées soit suivant lesdits cercles successifs, soit par une exploration alternativement radiale et circulaire. Selon une seconde réalisation, le support est une  
10 bande continue se déroulant depuis un rouleau d'alimentation et s'enroulant sur un rouleau récepteur, le tout étant logé dans une cassette jetable. Cela élimine la nécessité de laver le support comme dans le cas du disque. En général, 1 mm<sup>3</sup> représente le nombre de gouttes dont le résultat statistique est pris comme  
15 valeur pour un échantillon, et ainsi de suite pour les suivantes. Bien entendu, après chaque mesure, le support subit un lavage, contrôlé automatiquement.

Commentaires sur la seconde opération :

Le système utilisé comprend la combinaison d'un microscope équipé d'une optique spéciale, et d'une caméra vidéo, dont  
20 la photo est transmise à un mini-ordinateur en vue de la troisième opération. Ce microscope transmettant des informations en continu, il était donc nécessaire d'en assurer une mise au point correcte en permanence. A cet effet, il est prévu entre l'objectif et le  
25 support d'échantillons une vis micrométrique garantissant une focalisation mécanique constante. Ce microscope est de préférence éclairé en UV directs, puisque l'observation est photographiée par la caméra, qui peut recevoir davantage de lumière que l'oeil humain.

30 Commentaires sur la troisième opération :

La photographie de l'échantillon par la caméra est transmise à l'ordinateur qui va procéder à son analyse conformément à des techniques complexes mais bien connues. De ce fait il n'est pas nécessaire de développer la description de ces techniques.  
35 On se bornera donc à rappeler que l'image étant envoyée en mémoire dans l'ordinateur ("acquisition"), on détermine d'abord la valeur minimum de l'éclairement d'un pixel correspondant à une particule à prendre en considération ("seuillage"), puis, ce seuil étant fixé pour un échantillon, on détermine le contour de  
40 chaque particule. On notera toutefois que c'est en particulier

par l'exploitation de cette technique que le procédé de l'invention se différencie fondamentalement des techniques manuelles classiques, qui se bornaient à une comparaison visuelle avec une série de formes données. Cette différence se traduit à la fois par la précision et la rapidité des opérations, par opposition à la simple comparaison visuelle, lente, imprécise et source d'erreurs.

La phase suivante de cette opération est le tri entre les particules ainsi définies par leurs dimensions et leurs formes. Ce tri s'effectuant pour chaque goutte, les résultats de toutes les gouttes sont ensuite traités statistiquement, ce qui assure la précision des informations recueillies, aussi bien en un moment déterminé que dans leur évolution dans le temps.

Bien entendu, la technique générale de l'analyse d'image ou de forme ("pattern recognition") étant devenue classique, toutes les opérations auxiliaires également connues dans cette technique sont utilisables, telle que le prétraitement de l'image en vue de l'élimination des "bruits de fond", pour bénéficier d'une image plus nette, le filtrage, la dilatation, l'érosion ou la squelettisation de l'image, ces techniques pouvant intervenir dans des cas spécifiques.

On va maintenant illustrer l'invention en se référant à deux exemples d'applications pratiques de ce procédé.

#### Exemple 1.

Dans cet exemple, le procédé selon l'invention est appliqué à la recherche des bactéries dans le lait.

Dans ce cas, la première opération comporte la coloration de l'échantillon au moyen d'acridine orange à pH 6. Dans la goutte vont alors apparaître : les globules de graisses, non colorés, les leucocytes vivants, de forme semblables aux globules de graisse, mais qui en sont différenciés par leur coloration, les bacilles, en forme de batonnets, et les coques en forme de ronds, apparaissant avec ou sans acide ribonucléique (ARN) en cours de "mort" et acide desoxyribonucléique (ADN) revivifiables. On connaît donc ainsi dès lors le nombre de germes totaux et le nombre de leucocytes, que l'on identifie par épifluorescence, par éclairage par dessus à UV < 400 m, avec réémission d'un spectre vers 600 nano m que l'on peut filtrer.

On peut alors, dans les bacilles, rechercher le *Clostridium butyricum* et le *Pseudomonas fluorescens*. Pour les extraire on utilise l'immunofluorescence avec un serum correspon-

dant au germe cherché et un colorant spécifique.

On procède alors aux opérations suivantes sur l'échantillon, toujours à basse température :

5        a On obtient les germes totaux en ajoutant à l'échantillon 1 % de cyanure et 10 % d'acridine orange, et en soumettant des gouttes du produit de réaction aux opérations 2 et 3.

b On obtient le pseudomonas seul en recommençant l'essai a, mais sans colorant.

10       c On obtient le clostridium seul en recommençant a, mais en ajoutant à la fois l'acridine orange et le serum spécifique coloré.

      Quel que soit le processus a, b ou c choisi, on photographie alors l'image donnée par le microscope par une caméra, la photo étant transmise en mémoire d'ordinateur sous  
15       forme d'un rectangle découpé par 512 lignes et 512 colonnes, soit 262144 points ou pixels. La profondeur de chaque point c'est-à-dire la quantité de lumière reçue, est représentée par un chiffre ou "bit". Dans le cas présent, on utilise six bits, soit 64 niveaux, le zéro correspondant au noir et le 63 au  
20       blanc. Les images, étant des objets éclairés, se détachent sur fond noir (aux parasites près). Au départ d'une opération d'analyse, on fixe la valeur minimum d'éclairement (seuil) à partir de laquelle un point va être décompté comme élément d'objet. Ce "seuillage" étant fixé, on passe à la phase "contour", c'est-à-  
25       dire la détermination du périmètre de chaque objet, et on répertorie tous les objets dans un tableau, dans lequel, selon les coordonnées de chaque périmètre, on en détermine un certain nombre de paramètres, tels que la "plus grande longueur", ainsi qu' un "facteur de forme", qui, à partir du cercle, pris arbitrairement pour = 1, conduit à séparer les objets "longs" des objets  
30       "ronds". On trie alors dans le tableau les seuls objets intéressants en fonction des paramètres choisis, et les résultats sont enfin traités statistiquement, pour chaque goutte et pour l'ensemble des gouttes. Dans le cas présent, l'analyse d'une goutte représente une seconde et demi, avec un pourcentage admis d'erreur de  
35       5 %. Ces valeurs sont à rapprocher des durées, et de la marge d'erreur admises jusqu'à présent, et elles résultent de l'automatisation complète des opérations.

Exemple 2 : Analyse du sang.

40       L'application du procédé de l'invention permet dans ce

cas non seulement d'évaluer avec rapidité et précision les cellules proprement dites, c'est-à-dire les globules rouges et les globules blancs, mais également de déceler et de compter automatiquement les parasites qu'ils contiennent, et qui n'avaient  
5 jamais pu faire l'objet d'une telle opération antérieurement en raison de leur très petite taille. Ainsi par exemple, grâce à l'invention, il est maintenant possible de procéder à la recherche et au comptage automatique des parasites du paludisme dont la dimension est de l'ordre de 2 microns.

10 Plus précisément, l'analyse du sang par le procédé selon l'invention est réalisée en suivant le processus suivant :

En premier lieu, le dépôt sur le support est effectué de manière continue et automatique par pulvérisation ou soufflage. Cela représente un progrès par rapport aux techniques antérieures  
15 où chaque goutte de sang était écrasée entre un support et une plaquette de verre, ce qui détruisait ou altérerait les cellules.

La phase de coloration à l'acridine orange à pH 6 a pour résultat une différenciation entre les globules rouges qui, étant sans noyau, ne contiennent ni ARN ni ADN et demeurent donc  
20 non colorés, tandis que, au contraire, les globules blancs, étant vivants, contiennent un noyau et diverses inclusions, qui prendront des colorations différentes (ADN pour le noyau, ARN pour les inclusions).

Par contre, dans le cas de la présence de parasites sanguins à l'intérieur d'un globule rouge, ces parasites seront  
25 mis en évidence par coloration car ils contiennent de l'ADN et de l'ARN.

On procède à l'analyse d'image conformément aux techniques générales évoquées précédemment, mais en prenant en  
30 compte la complexité des "objets".

En effet, si les globules blancs, colorés, sont bien connus et faciles à identifier et à compter, à partir de leur contour, on trouve, à l'intérieur de ce contour extérieur un ou plusieurs contours intérieurs, constituant des noyaux, à l'intérieur  
35 desquels, on peut déceler encore d'autres constituants. Il devient alors possible, en fonction du nombre d'objets ainsi décelé, d'identifier et compter différents types de constituants polynucléaires.

Il en est de même pour les parasites des globules rouges, ce qui représente une grande originalité du présent procédé.  
40

Ainsi par exemple, le parasite du paludisme se présente sous forme d'un anneau ouvert (ARN) portant à ses deux extrémités des excroissances ou chatons (ADN), ce qui, malgré leur très petites dimensions (2 microns) permet pour la première fois leur comptage automatique et continu dans le sang soumis à l'analyse.

Les applications de ce nouveau procédé, qui ont été évoquées au début, sont en fait pratiquement illimitées, et notamment dépassent le simple comptage de particules dans un liquide. Ainsi on peut en envisager l'application au tri et au comptage de défauts de surfaces dans des matériaux solides. L'adaptation de ce procédé à de telles applications ainsi qu'à d'autres fera l'objet de futurs additifs au présent brevet.

## REVENDICATIONS

1. Procédé pour l'identification, le tri et le comptage continus et automatiques de particules de petites dimensions, selon la revendication 1 du Brevet Principal, caractérisé en ce qu'il consiste, dans une première opération à préparer et  
5 déposer de manière continue une succession d'échantillons sur un support en déplacement continu, en les répartissant sur le trajet d'exploration d'un système d'enregistrement par une caméra vidéo des images de ces échantillons données par un microscope, dans une seconde opération, à procéder audit enregistrement, dans une troisième opération à décomposer l'image de  
10 chaque échantillon suivant un découpage quadrillé en vue, dans une quatrième opération de l'analyse de ladite image conformément aux techniques dites de "pattern recognition", et enfin à traiter statistiquement les résultats de cette analyse, à les digitaliser et à les délivrer matériellement à l'opérateur.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la préparation intervenant dans la première opération  
15 consiste en une coloration spécifique, suivie d'une observation par épifluorescence.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le dépôt de l'échantillon sur le support est effectué par  
20 pulvérisation ou soufflage continu.
4. Procédé selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit support continu est un disque de verre tournant  
25 autour de son axe vertical, et subissant un lavage continu.
5. Procédé selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit support est une bande continue se déroulant d'un premier rouleau et enroulé sur un second rouleau après un  
30 seul usage, cette bande étant enfermée dans une cassette jetable.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le microscope est équipé de moyens assurant sa mise au point automatique permanente sur l'échantillon.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le microscope est éclairé en UV.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications  
35 précédentes, caractérisé en ce que le colorant utilisé dans la première opération est l'acridine orange et/ou un serum spécifique coloré.

9. Application du procédé selon les revendications 1 à 8, à la recherche des bactéries dans le lait.

10. Application du procédé selon les revendications 1 à 8 à l'analyse du sang et plus spécialement à la recherche, dans  
5 le sang, des parasites tels que le parasite du paludisme.

DERWENT-ACC-NO: 1997-406843

DERWENT-WEEK: 199738

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Optical microscope for analysing malarial parasites, schistosomes - has absorption filter which is switched ON or OFF is provided in lower part of tubular part in optical axis

INVENTOR-NAME:

PRIORITY-DATA: 1995JP-0349647 (December 21, 1995)

PATENT-FAMILY:

| PUB-NO        | PUB-DATE      | LANGUAGE | PAGES | MAIN-IPC    |
|---------------|---------------|----------|-------|-------------|
| JP 09179030 A | July 11, 1997 | N/A      | 005   | G02B 021/00 |

INT-CL (IPC): G02B021/00

ABSTRACTED-PUB-NO: JP09179030A

BASIC-ABSTRACT: The microscope has a light source part (1) from which light is supplied. A condenser lens cylinder (2) condenses light to a desired angle. A mirror cylinder (3) reflects light from the condenser cylinder. The light rays are reflected by a stage (6) through an objective lens (7) along an optical axis (B). A condenser part (4) is formed to the lower part of the stage.

An excitation filter (23) and a frost filter (22) adheres to the condenser part. An absorption filter (41) which is switched ON or OFF is provided in the lower part of a tubular part (8) on the optical axis.

ADVANTAGE - Provides easy diagnosis of malaria. Reduces degree of fault diagnosis.



DERWENT-ACC-NO: 1998-547294

DERWENT-WEEK: 199847

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Micro-organism classification method for quality control in beverage production - involves obtaining eccentricity of microbial image obtained by image processor, based on which microorganism is classified

INVENTOR-NAME:

PRIORITY-DATA: 1997JP-0046025 (February 28, 1997)

PATENT-FAMILY:

| PUB-NO        | PUB-DATE           | LANGUAGE | PAGES | MAIN-IPC    |
|---------------|--------------------|----------|-------|-------------|
| JP 10240950 A | September 11, 1998 | N/A      | 008   | G06T 007/60 |

INT-CL (IPC): C12M001/34; C12Q001/04 ; G06T007/00 ; G06T007/60

ABSTRACTED-PUB-NO: JP10240950A

BASIC-ABSTRACT: The method involves digitising the micro-organism image formed by a microscope (1), using an image processor (2). An image forming unit picks up information about the external structure of a microbial cell and forms an image. The image is digitised and converted to image data which is classified by a classification unit. The image data is stored in a memory. The image processor obtains a main curve of the microbial cell based on the stored image data. A shortest line joining the ends of the main curved and longest perpendicular line extending from the shortest line to the curve are obtained. The eccentricity of the microbial cells is calculated from the length of the longest perpendicular line and the main curve. The micro-organism is classified based on its eccentricity.

ADVANTAGE - Enables comprehending existence of harmful micro-organism in short time. Assists in development of database of microbes.

PAT-NO: DE004211904A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: DE 4211904 A1

TITLE: Ascertaining type list for liquid sample examination - using imaging pick-up and localising appts. for recognising and locating object within registered image data to enable automatic output from ident

PUBN-DATE: November 19, 1992

INVENTOR-INFORMATION:

| NAME            | COUNTRY |
|-----------------|---------|
| MAIER, WERNER   | DE      |
| VOLK, CHRISTIAN | DE      |

ASSIGNEE-INFORMATION:

| NAME           | COUNTRY |
|----------------|---------|
| MAIER WERNER   | DE      |
| VOLK CHRISTIAN | DE      |

APPL-NO: DE04211904

APPL-DATE: April 9, 1992

PRIORITY-DATA: DE04211904A (April 9, 1992)

INT-CL (IPC): G01N015/10;G01N033/48 ;G01N035/00

EUR-CL (EPC): G01N033/18 ; G01N033/18

US-CL-CURRENT: 435/288.7

ABSTRACT:

The method includes optical detection of the sample (13) as a result of image data; identification and location of the objects (14) in the detected image data; and the automatic identifying of the located objects (14) by the automatic comparison of the respective located object, with a determined group of reference objects. The reference objects are selected from a large group of

reference objects on the basis of the coarse characteristics of the located objects (14), obtained from the image data. The identified objects (14) are counted according to the respective types; and the counted objects (14) are entered in the type list (48). The system for carrying out the method includes a camera type system (16), a locating unit (40), an identifying unit (44) and a counter (46). USE/ADVANTAGE - Ecosystem investigations. Subjective analysis is excluded. Automatic identification and analysis of specimens including bacteria from 1 micron size. Cluster of objects can be examined with background taken into consideration.



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nlegungsschrift  
⑩ DE 42 11 904 A 1

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
G 01 N 33/48  
G 01 N 15/10  
G 01 N 35/00

②1 Aktenzeichen: P 42 11 904.9  
②2 Anmeldetag: 9. 4. 92  
②3 Offenlegungstag: 19. 11. 92

DE 42 11 904 A 1

③0 Innere Priorität: ③2 ③3 ③1  
09.04.91 DE 41 11 472.8

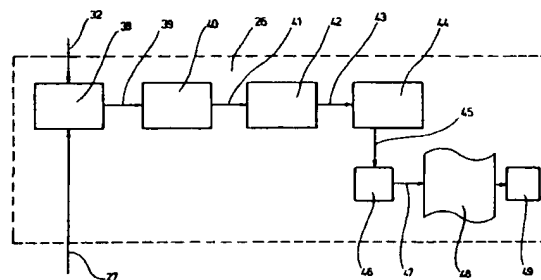
⑦1 Anmelder:  
Maier, Werner; Volk, Christian, 7000 Stuttgart, DE

⑦4 Vertreter:  
Witte, A., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Weller, W., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat.; Gahlert, S., Dipl.-Wirtsch.-Ing.Dr.-Ing.,  
Pat.-Anwälte, 7000 Stuttgart

⑦2 Erfinder:  
gleich Anmelder

⑤4 Verfahren und Vorrichtung zum Erstellen einer Artenliste für eine flüssige Probe

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Erstellen einer Artenliste (48) für eine flüssige Probe mit ggf. form- und/oder ortsveränderlichen Objekten unterschiedlicher Arten zur Ermittlung des ökologischen Zustandes der Probe. Die Vorrichtung weist eine Bildaufnahmevorrichtung zum optischen Erfassen der Probe als Folge von Bilddaten auf. Ferner ist eine Lokalisierereinrichtung (40) zum Erkennen und Lokalisieren der Objekte in den erfaßten Bilddaten sowie eine Identifizierungseinrichtung (44) vorgesehen, die zum automatischen Identifizieren der lokalisierten Objekte dient. Die Vorrichtung weist weiterhin eine Zähleinrichtung (46) zum Zählen der identifizierten Objekte nach der jeweiligen Art sowie zum Eintragen der gezählten Objekte in die Artenliste (48) auf (Fig. 2). Die Identifizierungseinrichtung umfaßt dabei eine Sucheinrichtung, die die lokalisierten Objekte mit einer Gruppe von Referenzobjekten vergleicht, die sich aufgrund von aus den Bilddaten gewonnenen Grobmerkmalen des lokalisierten Objektes aus einer größeren Gruppe von Referenzobjekten ergeben.



DE 42 11 904 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Erstellen einer Artenliste für eine flüssige Probe mit ggf. form- und/oder ortsveränderlichen sich z. T. gegenseitig überdeckenden und überlappenden Objekten unterschiedlicher Arten zur Ermittlung des ökologischen Zustandes der Probe.

Ein derartiges allerdings manuelles Verfahren ist aus der Praxis bekannt. Es dient zur Untersuchung von belebten Schlämmen u.ä. Biomassen, zur Bestimmung von Gewässergütern und/oder zur Überwachung biologischer Abwasserreinigungssysteme. Zu diesem Zweck wird das Ökosystem "belebter Schlamm" untersucht, das einen definierten Raum mit generell gleichen Eigenschaften darstellt, der in den Lebensraum, das nicht lebende Biotop, und in die Artengemeinschaften oder die Lebensgemeinschaft, die Biozönose zerfällt.

Die Biozönose setzt sich aus unterschiedlichen Arten zusammen, die sehr verschiedene Objektdichten aufweisen. Darüberhinaus reicht die Größe der Objekte, zu denen Algen, Pilze, Protozoen und Metazoen zählen, von 1 µm (Bakterien) bis zu mehreren mm (Kleinstlebewesen). Pro Probe finden sich bis 100 und mehr Objektarten und je Art von einem Objekt bis zu mehreren tausend Objekten.

Weiterhin finden sich in der Probe nicht nur lebende Objekte, sondern auch sonstige Partikel, wie Flocken, Fasern, Haare etc.

Mit "Art" oder "Arten" werden im folgenden Text sämtliche Objekte des Ökosystems bezeichnet, also beispielsweise sowohl Organismen als auch Flocken, Haare etc.

Zweck der Untersuchung ist es, Aussagen über Vorgeschichte, Zustand und wahrscheinliche Weiterentwicklung des Ökosystems machen zu können. Weiterhin geht es um die Überwachung des Betriebsablaufes und um einen "Gesundheitscheck" des Ökosystems eines biologischen Abwasserreinigungssystems. Die im Rahmen der Untersuchung gewonnenen Aussagen werden genutzt, um die betriebstechnischen und die chemisch-physikalischen Daten der Anlage zu bestätigen und/oder zu ergänzen bzw. im Falle eines Störfalles gezielt weitere Untersuchungen zu veranlassen. Die Daten werden weiterhin zu einer Langzeituntersuchung der Biozönose der jeweiligen Anlage verwendet.

Im Rahmen dieser Untersuchungen ist es erforderlich, eine Artenliste sämtlicher Objekte in einer Probe (z. B. 50 µl) zu erstellen und auszuwerten. Das Erstellen der Artenliste wird zur Zeit von Personal mit unterschiedlicher Vorbildung vorgenommen, das dazu ein Mikroskop und ggf. eine CCD-Kamera mit Videorekorder zur Dokumentation der untersuchten Proben verwenden.

Die Einordnung der unterschiedlichen Objekte in die verschiedenen Objektklassen oder Arten ist größtenteils Wissens- und Erfahrungssache, wobei die dabei verwendeten Methoden je nach dem Erfahrungsstand des mit der Untersuchung Beauftragten sehr unterschiedlich sind. Naturgemäß ist auf diese Weise nur eine sehr unvollständige Datenerfassung möglich, die lediglich ein Teil der zu untersuchenden Biomasse repräsentiert.

Die auf diese Weise erstellte Artenliste wird für eine Fortschreibung der Langzeitüberwachung (Populationswachstum der einzelnen Arten; Flockenbildung und -alter; Komplexität der Biozönose; Sauerstoffgehalt anhand von Indikatororganismen; Saprobienstufen als Index für die Wassergüte) in einen Computer

eingetragen und zur Erkennung von periodischen Prozessen schon im frühen Stadium verwendet. Weiterhin führt der Computer eine Modellerstellung der Biozönose durch, um die spezifischen Abhängigkeiten zwischen den Arten zu bestimmen und um so zwischen normalen/üblichen Veränderungen der Biozönose einerseits und von außen hervorgerufenen Abweichungen andererseits unterscheiden zu können.

Mit dem insoweit beschriebenen Untersuchungsverfahren werden nicht nur Kläranlagen überprüft, auch natürliche Ökosysteme wie Seen, Flüsse, Meere etc. werden damit untersucht/überwacht.

Das vom Menschen durchzuführende Erstellen der Artenliste bedingt nicht nur den limitierenden Zeitfaktor sondern auch eine unerwünscht hohe Fehlerrate. Darüberhinaus ist die auf diese Weise gewonnene Datenmenge für einen umfassenden Überblick über den Zustand des jeweils untersuchten Ökosystems oft viel zu gering.

Lediglich der Vollständigkeit halber sei hier erwähnt, daß eine umfassende chemische Analyse von Belebtschlämmen zwar möglich ist, aber noch länger dauert als die eingangs beschriebene Bestimmung unter Heranziehung einer vom Menschen erstellten Artenliste.

Nun ist es zwar bekannt, Fluoreszenzmikroskope mit Kamerasystemen zu verwenden, die Proben sind hier jedoch fast ausschließlich zweidimensional und trocken. Flüssige Proben mit bewegten Objekten können mit solchen, insbesondere in Forschungslaboratorien zu findenden Systemen, nicht untersucht werden.

Weiterhin ist es bekannt, auf einem Förderband transportierte Gegenstände, wie z. B. Schrauben etc. mit Hilfe eines Handhabungsroboters zu sortieren, wobei der Roboter über ein Bildverarbeitungssystem angesteuert wird. Das Bildverarbeitungssystem sucht nach gewünschten (fehlerfreien) Objekten, die der Roboter in entsprechende vorgegebene Kästen transportiert. Hier hat der Rechner also eine Wiederfindungserwartung bezüglich der zu sortierenden Objekte, d. h. es ist lediglich eine Ja/Nein-Entscheidung zu treffen, ob das Objekt mit einem im Rechner gespeicherten Referenzobjekt übereinstimmt. Ein derartiges Bildverarbeitungssystem sucht also nach gewünschten Objekten, während es im Falle der Erstellung der Artenliste um ein Identifizieren unbekannter Objekte geht, deren Lage im Raum beliebig sein kann.

Darüberhinaus können die Objekte in den zu untersuchenden flüssigen Proben auch als Clusterobjekte auftreten. Unter Clusterobjekten werden hier mehrere zusammenhängende Objekte verstanden, z. B. können sich an einer Flocke mehrere Mikroorganismen anheften, so daß ein Clusterobjekt entsteht, das aus unbelebten und belebten Objekten ggf. verschiedener Arten besteht. Die Objekte eines derartigen Clusterobjektes können sich darüberhinaus gegenseitig bedecken bzw. überlappend vorliegen oder gar miteinander verflochten sein, so daß zunächst eine Trennung des Clusterobjektes in die einzelnen Objekte erforderlich ist. Wie bereits erwähnt, bewegen sich einige der Objekte in der Probe, d. h. die Objekte sind ggf. orts- und formveränderlich. Eine Objektart ist darüberhinaus in verschiedenen Entwicklungsstufen anzutreffen, also in verschiedenen Größen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß zwischen den Abmaßen der kleinsten und der größten Objekte nahezu vier Größenordnungen liegen können.

Wegen der hohen Formverschiedenheit der lebenden Objekte können bei dem angestrebten Verfahren nicht alle möglichen Erscheinungsformen in einer Art Referenz-

renzdatenbank gespeichert werden, da deren Zahl astronomisch hoch ist.

Mit den bekannten Verfahren und Systemen der Bildverarbeitung ist damit das Erstellen der Artenliste bisher nicht möglich.

Aus der EP-B-00 73 140 sind ein derartiges Verfahren und eine derartige Vorrichtung zur zweidimensionalen Untersuchung von Vorlagemasken für die Erstellung von Halbleiterbauteilen bekannt. Die zu untersuchende Maske wird auf einen X/Y-Kreuztisch gelegt und im Durchlichtverfahren kontrastiert. Eine CCD-Kamera nimmt ein Bild dieser Maske auf und leitet es einer Signalverarbeitungseinrichtung zur Erzeugung von Bildmusterdaten zu.

Die Vorrichtung weist einen Speicher für die aktuellen Daten der zu untersuchenden Maske und für vorgegebene Bildmusterdaten einer Referenzmaske auf.

Um das Problem der beim Ätzprozeß auftretenden abgerundeten Ecken zu berücksichtigen, werden die Referenzdaten, die rechtwinklige Ecken enthalten, derart verändert, daß Vergleichsbilder mit noch zulässigen Eckenabrundungen für einen visuellen Vergleich oder für einen automatischen Vergleich bereitgestellt werden. Der aktuelle Datensatz und der modifizierte Referenzdatensatz werden dazu einer Vergleichereinrichtung zugeführt, die ermittelt, ob die gemessenen und die vorgegebenen Konturen innerhalb einer Fehlerschwelle übereinstimmen.

Ein ähnliches Verfahren und eine entsprechende Vorrichtung sind aus der EP-A-01 47 205 bekannt. Hier weist das zu untersuchende Muster ein regelmäßig wiederkehrendes Grundmuster auf, das dementsprechend nur einmal als Referenzbildmusterdatensatz vorhanden sein muß.

Bei diesem Verfahren werden die harten Kanten der Vorlagendaten in einer vorgewählten Breite durch nachträglich eingeführte Grau-Werte aufgelöst, um einen Vergleich innerhalb bestimmter Fehlerbreiten zu ermöglichen.

Wie bereits eingangs erwähnt, werden bei diesen bekannten Verfahren die gemessenen Daten der zu untersuchenden Masken unverändert eingelesen und mit vorgegebenen Daten, die ggf. verändert werden, verglichen.

Ferner ist aus der DE-OS 29 03 625 eine Vorrichtung zur automatischen Blutanalyse bekannt. Die Vorrichtung verwendet ein digitales Bild- und Mustererkennungssystem mit einer Mikroskopoptik, wobei ein Verschiebetisch und eine Fokuskontrolle zum Einsatz kommen. Die zu analysierenden Blutzellen müssen hier räumlich voneinander getrennt in einer einzelligen Schicht vorliegen, wobei nur Objekte in einem bestimmten Größenbereich ausgewertet werden. Als zusätzliche Kriterien werden Form und Farbe der Objekte bestimmt.

Wie schon bei dem oben erwähnten Handhabungsroboter hat auch hier das System eine Wiederfindungserwartung bezüglich der zu sortierenden Objekte. Objekte, die in einer dem Rechner nicht vorbekannten Form vorliegen, die also beispielsweise sich zu Clustern zusammengelagert haben oder die eine nicht vorhergesehene Form angenommen haben, werden als Schmutzeffekt ausgesondert. Formveränderliche oder gar bewegliche Objekte, die sich ggf. zu größeren Clustern zusammengelagert haben, können mit dieser Vorrichtung also nicht analysiert werden.

Eine entsprechende Vorrichtung zur Blutanalyse ist in der DE-OS 24 15 974 beschrieben. Die bekannte Vor-

richtung umfaßt einen Verschiebetisch, welcher die zu untersuchende trockene Probe unter einem Mikroskop verfährt. Ferner ist eine Fernsehkamera vorgesehen, welche den vom Mikroskop jeweils erfaßten Teil der Probe auf einem Bildschirm darstellt. Während das Anfahren der einzelnen Blutkörperchen automatisiert erfolgen kann, ist ein Operateur erforderlich, der die Blutkörperchen identifiziert und durch Drücken einer entsprechenden Taste klassifiziert. Damit ist dieses Verfahren mit den selben Nachteilen behaftet wie das eingangs erwähnte manuelle Verfahren zur Untersuchung von belebten Schlämmen.

Aus der DE-OS 33 13 789 ist eine mikroskopische Untersuchungseinrichtung bekannt, bei der im Ermittlungsbetrieb kernhaltige Objekte aufgefunden und anhand einer Reihe von Merkmalen, wie beispielsweise Farbe, Größe und Struktur klassifiziert werden. Auch mit dieser Vorrichtung können nur Objekte klassifiziert werden, für welche eine Wiederfindungserwartung vorhanden ist. Ferner müssen sich die zu untersuchenden Objekte durch wenige aus den optischen Daten ermittelbare Merkmale eindeutig identifizieren lassen.

Damit ist auch dieses Verfahren nicht geeignet, formveränderliche Objekte, die sich ggf. zu Clustern zusammenfinden können, in einer flüssigen Probe aufzufinden, zu identifizieren und zu klassifizieren.

Weiterhin ist in der DE-OS 38 36 716 ein interaktives Verfahren zur Auswertung von Zellbildern beschrieben, bei dem fachlich geschultes Personal erforderlich ist, um im Dialogbetrieb den Rechner bei der Auswertung zu führen und zu unterstützen. Damit ist dieses Verfahren mit den eingangs bereits erwähnten Nachteilen — limitierender Zeitfaktor, hohe Fehlerrate — von manuellen Verfahren behaftet.

Aus den bereits geschilderten Gründen sind alle diese Verfahren zum automatischen Erstellen der Artenliste nicht geeignet.

Ausgehend von dem insoweit zitierten Stand der Technik ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Erstellen einer Artenliste für eine flüssige Probe zu schaffen, bei dem bzw. bei der ein schneller und hoher Datendurchsatz gewährleistet ist und wobei nur eine geringe Fehlerhäufigkeit auftritt. Die Vorrichtung soll außerdem preiswert zu erstellen und zu betreiben sein. Ferner sollen mit dem neuen Verfahren bzw. der neuen Vorrichtung auch formveränderliche Objekte identifiziert werden können, für deren konkrete jeweilige Form keine Wiederfindungserwartung vorliegt, die also so nicht eindeutig vorhersehbar sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren der eingangs genannten Art mit den Schritten:

- a) optisches Erfassen der Probe als Folge von Bilddaten;
- b) Erkennen und Lokalisieren der Objekte in den erfaßten Bilddaten;
- c) Automatisches Identifizieren der lokalisierten Objekte durch automatisches Vergleichen des jeweiligen lokalisierten Objektes mit einer bestimmten Gruppe von Referenzobjekten, die aufgrund von aus den Bilddaten gewonnenen Grobmerkmalen des lokalisierten Objektes aus einer größeren Gruppe von Referenzobjekten ausgewählt werden;
- d) Zählen der identifizierten Objekte nach den jeweiligen Arten; und

e) Eintragen der gezählten Objekte in die Artenliste.

Diese Aufgabe wird ebenfalls gelöst durch eine Vorrichtung mit:

- a) einer Bildaufnahmevorrichtung zum optischen Erfassen der Probe als Folge von Bilddaten;
- b) einer Lokalisierungseinrichtung zum Erkennen und Lokalisieren der Objekte in den erfaßten Bilddaten;
- c) einer Identifizierungseinrichtung zum automatischen Identifizieren der lokalisierten Objekte; und
- d) einer Zählereinrichtung zum Zählen der identifizierten Objekte nach den jeweiligen Arten sowie zum Eintragen der gezählten Objekte in die Artenliste, wobei die Identifizierungseinrichtung eine Sucheinstellung umfaßt, die die lokalisierten Objekte mit einer Gruppe von Referenzobjekten vergleicht, die sich aufgrund von aus den Bilddaten gewonnenen Grobmerkmalen des lokalisierten Objektes aus einer größeren Gruppe von Referenzobjekten ergeben, und ein identifiziertes Objekt als solches an die Zählereinrichtung meldet.

Die Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst, denn die Anmelder haben erkannt, daß die Hauptfehlerquelle und der Hauptzeitfaktor in dem Identifizieren der Objekte liegt. Durch das automatische Identifizieren mit Hilfe einer Identifizierungseinrichtung werden Fehler weitgehend ausgeschlossen. Das neue Verfahren und die neue Vorrichtung arbeiten darüberhinaus wesentlich schneller als das auf sich gestellte Personal. Das Lokalisieren der Objekte in den erfaßten Bilddaten könnte zwar noch manuell erfolgen, die Bedienungsperson kann hier jedoch wesentlich ermüdungsfreier arbeiten, als wenn sie auch noch die lokalisierten Objekte identifizieren müßte. Außerdem ist es jetzt nicht mehr unbedingt erforderlich, qualifiziertes Fachpersonal einzusetzen, für das Lokalisieren von Objekten beispielsweise auf einem Datensichtgerät, können auch angelernte Kräfte eingesetzt werden.

Da das Verfahren in automatisierte/automatisierbare Einzelschritte zerlegt ist, können beispielsweise erst alle Objekte lokalisiert werden bevor die automatischen Identifizierungsprozesse ablaufen. Andererseits ist es aber auch möglich, wenn die automatische Identifizierungseinrichtung sehr schnell arbeitet, jedes lokalisierte Objekt sofort zu identifizieren.

Die neue Vorrichtung bzw. das neue Verfahren arbeitet also derart, daß zunächst aus den Bilddaten Grobmerkmale der Objekte extrahiert werden, aufgrund welcher dann aus den vorhandenen Referenzobjekten eine enge Gruppe ausgewählt wird, mit der dann die zu identifizierenden Objekte verglichen werden. Es handelt sich also sozusagen um ein wissensbasiertes Verfahren.

In einer bevorzugten Weiterbildung ist das Verfahren durch den weiteren Schritt gekennzeichnet:

- f) Automatische, interpretierende Bewertung der Eintragungen in der Artenliste unter Verwendung zielangepaßter Methoden aus Ökologie, Biologie und Ethologie.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß die Artenliste nicht nur automatisch erstellt, sondern auch automatisch interpretiert wird, so daß mit dem neuen Verfahren ohne Zwischenschaltung des Menschen eine Aussage

über den ökologischen Zustand der untersuchten Probe möglich wird.

Bei dem bisher beschriebenen Verfahren ist es bevorzugt, wenn vor dem Schritt des automatischen Identifizierens das jeweils lokalisierte Objekt folgenden Verfahrensschritten unterzogen wird:

- c1) Automatisches Erkennen des Vorliegens eines aus mehreren zusammenhängenden sich ggf. überlappenden, miteinander verflochtenen Objekten bestehenden Clusterobjektes;
- c2) Abspalten eines Subobjektes von dem Clusterobjekt und
- c3) Vergleichen des Subobjektes oder des lokalisierten Objektes mit Referenzobjekten (Schritt c von oben).

Hier ist von Vorteil, daß ein Clusterobjekt, das automatisch erkannt wird, in Subobjekte zerlegt wird, die sukzessive mit den zur Verfügung stehenden Referenzobjekten verglichen werden.

Da die Zahl der möglichen Clusterobjekte, die sich in einer flüssigen Probe finden können, riesig groß ist, wäre es nicht möglich, alle möglichen Clusterobjekte als Referenzobjekte vorrätig zu halten. Durch das Zerlegen der Clusterobjekte in Subobjekte wird die Zahl der erforderlichen Referenzobjekte und damit die Zahl der erforderlichen Vergleiche folglich stark reduziert. Dies führt zu einem schnelleren Ablauf des neuen Verfahrens.

In diesem Ausführungsbeispiel ist es bevorzugt, wenn das automatische Identifizieren die weiteren Schritte aufweist:

- c4) Auswählen des zu einem identifizierten Subobjekt gehörenden Referenzobjektes,
- c5) Erzeugen eines modifizierten Clusterobjektes durch Vermindern des Clusterobjektes um das ausgewählte Referenzobjekt und
- c6) Behandeln des modifizierten Clusterobjektes wie ein lokalisiertes Objekt.

Diese Maßnahme ist insofern vorteilhaft, als bei dem Abspalten des Subobjektes nicht zwangsläufig ein vollständiges Hauptobjekt von dem Clusterobjekt abgespalten wurde. Es ist möglich, daß das abgespaltene Subobjekt nur ein Teil eines an dem Clusterobjekt hängenden Einzelobjektes ist. Durch das Auswählen des zu dem Teilobjekt gehörenden Referenzobjektes oder Hauptobjektes wird die Zahl der erforderlichen Zerlegungen eines Clusterobjektes reduziert. Das Clusterobjekt wird nämlich nicht nur um das Subobjekt, sondern um weitere Teilobjekte des zu dem identifizierten Subobjekt gehörenden Hauptobjektes oder Referenzobjektes reduziert. Das modifizierte Clusterobjekt enthält also ggf. wesentlich weniger Subobjekte als wenn nur das zuvor angesprochene Subobjekt von dem Clusterobjekt abgezogen worden wäre.

Hier ist es weiter bevorzugt, wenn das automatische Erkennen des Vorliegens eines Clusterobjektes die Schritte umfaßt:

- c1a) Bestimmung einer Länge/maximalen Ausdehnung des lokalisierten Objektes,
- c1b) Bestimmung von quer zu der Länge verlaufenden Breiten des lokalisierten Objektes und
- c1c) Beurteilung der Abweichungen der Breiten untereinander sowie der Lage der Breiten zu der Länge.

ge, um das Vorliegen eines Clusterobjektes zu bestimmen.

Bei diesen Maßnahmen ist von Vorteil, daß aus rein geometrischen Angaben, nämlich der Länge und den quer zu der Länge genommenen Breiten erkannt werden kann, ob ein Objekt oder ein Clusterobjekt vorliegt. Bei einem Clusterobjekt weichen nämlich die Breiten sehr stark voneinander ab, da beispielsweise lange, dünne Objekte und eher kugelförmige Objekte miteinander verbunden sind. Weiterhin liegen bei Clusterobjekten, die beliebige geometrische Formen annehmen, zumindest einige der Breiten "außerhalb" der Länge, d. h. das Clusterobjekt ist dermaßen gewunden, daß die Länge teilweise außerhalb des Umrisses des Clusterobjektes verläuft.

In einer Weiterbildung des Verfahrens ist es bevorzugt, wenn der Schritt des Erkennens und Lokalisierens der Objekte die automatische Überführung eines Objektes in ein Teilbild und danach das automatische Detektieren von in sich geschlossenen Umrissen umfaßt.

Bei dieser Maßnahme ist von Vorteil, daß durch das Überführen eines Objektes in ein Teilbild zunächst die weiter zu verarbeitenden Daten reduziert werden, es muß nicht das gesamte Bild, sondern nur das ein oder mehrere Objekte umfassende Teilbild weiter verarbeitet werden.

Ferner ist es bevorzugt, wenn der Schritt des optischen Erfassens der Probe das automatische Aufnehmen von Bildfeldern unterschiedlicher Vergrößerung umfaßt, wobei von der Probe je Vergrößerung über ihr Volumen verteilte Bildfelder aufgenommen werden.

Auf diese vorteilhafte Weise kann die Probe sukzessiv mit verschiedenen Vergrößerungsfaktoren abgetastet oder gescannt werden, so daß in Abhängigkeit von der Größe der zu lokalisierenden Objekte das gesamte Volumen der Probe mit einer gewissen Anzahl von Bildfeldern vollständig erfaßt werden kann. Da dieses Abtasten automatisch erfolgt, werden die beim manuellen Durchsuchen einer flüssigen Probe häufig auftretenden Fehler — es werden bestimmte Bereiche der Probe "vergessen" — vermieden. Auch wird die Probe so mit sämtlichen erforderlichen Vergrößerungsfaktoren durchsucht. Wegen der nahezu vier Größenordnungen überstreichenden verschiedenen Größen der einzelnen Objekte führt dies zu einem hohen Datenaufkommen. Durch den automatisierten Ablauf ist sichergestellt, daß sämtliche Daten erfaßt und verarbeitet werden.

Hier sei erwähnt, daß unter "Bildfelder" eine Zusammenstellung oder Zusammenfassung von "Bilddaten" verstanden wird, die einen bestimmten Abschnitt der Probe wiedergeben. Bei "Bildfeldern" handelt es sich folglich um "zusammengehörende" Bilddaten.

Bei diesem Verfahren ist es weiterhin bevorzugt, wenn der Schritt des Lokalisierens das Zusammenfassen mehrerer Bildfelder, über die sich ein Objekt erstreckt, zu einem Überlagerungsbild umfaßt.

Durch diese vorteilhafte und einfache Maßnahme werden Objekte, deren Größe so ist, daß sie sich über mehrere Bildfelder erstrecken, dennoch als ein Objekt lokalisiert und können in einem einzigen Vergleichsablauf einem Referenzobjekt zugeordnet werden.

In einer Weiterbildung des Verfahrens ist es bevorzugt, wenn der Schritt des Erkennens und Lokalisierens der Objekte das Detektieren von Bereichen gleicher oder ähnlicher Echtfarbe, Echtfarbmuster oder Echtfarbbereiche umfaßt.

Diese Maßnahme ist insofern vorteilhaft, als es in den

Bilddaten typische Farben für Flocken, Algen, Fäden etc. sowie für den Hintergrund gibt. Auf diese Weise können beispielsweise die immer grün erscheinenden Algen oder die jeweils gelblich zu erkennenden Flocken von dem immer andersfarbigen Hintergrund unterschieden werden.

Ferner ist es bevorzugt, wenn der Vergleich zwischen Objekt bzw. Suchobjekt einerseits und Referenzobjekt andererseits auf der Basis dreidimensionaler virtueller Vektordarstellungen erfolgt.

Durch den quasi-optischen virtuellen Vergleich wird gegenüber dem reinen Vergleich von extrahierten Grobmerkmalen der Vorteil erzielt, daß auch Merkmale in die Identifizierung einbezogen werden können, welche sich nicht in Form von beispielsweise Algorithmen niederlegen lassen. So können die Referenzobjekte Feinststrukturen aufweisen, anhand derer ein leichtes Identifizieren der Suchobjekte möglich ist, während die Aufspaltung dieser Feinststrukturen in Merkmale, die einem binären Entscheidungsbaum zugrundeliegen würden, nicht möglich erscheint.

In diesem Ausführungsbeispiel ist es ferner bevorzugt, wenn der Schritt des automatischen Erkennens eines Clusterobjektes das Zerlegen des Clusterobjektes in Bereiche verschiedener Echtfarben, Echtfarbbereiche und/oder Echtfarbkontraste umfaßt.

Diese Maßnahme ist insofern von Vorteil, als sich ein Clusterobjekt immer in Bereiche verschiedener Farben und Farbkontraste aufspalten läßt. Auf diese Weise ist es möglich, aus den Bilddaten zusätzliche — physikalische Größen betreffende — Aussagen über ein Clusterobjekt zu gewinnen, die eine Zerlegung in Subobjekte ermöglichen.

Außerdem ist es hier bevorzugt, wenn das Clusterobjekt in Bereiche unterschiedlicher Bewegung, geometrischer Form und/oder Größe zerlegt wird.

Auch diese Kriterien ermöglichen in vorteilhafter Weise ein automatisches Erkennen von Subobjekten in einem Clusterobjekt.

Hinsichtlich der neuen Vorrichtung ist es bevorzugt, wenn sie eine Bewertungseinrichtung zur automatischen, interpretierenden Bewertung der Eintragung in die Artenliste unter Verwendung zielangepaßter Methoden aus Ökologie, Biologie und Ethologie umfaßt.

Diese Maßnahme hat den bereits erwähnten Vorteil, daß auch bei der Bewertung der Artenliste der Mensch als mögliche Fehlerquelle ausgeschaltet wird.

Hier ist es ferner bevorzugt, wenn die Sucheinrichtung einen virtuell-optischen Vergleich umfaßt, der für den Vergleich zwischen Objekt und Referenzobjekt auf der Basis dreidimensionaler virtueller Vektordarstellungen vorgesehen ist.

Bei dieser Maßnahme ist von Vorteil, daß der quasi-optische Vergleich dreidimensionaler Darstellungen es ermöglicht, Feinststrukturen zu berücksichtigen, die sich nicht als vergleichbare Einzelmerkmale aus den Bilddaten extrahieren lassen.

Weiterhin ist es bevorzugt, wenn die Identifizierungseinrichtung eine Clusterzerlegungseinrichtung zum Erkennen von aus mehreren zusammenhängenden, sich ggf. überlappenden oder miteinander verflochtenen Objekten bestehenden Clusterobjekten und zum Zerlegen der Clusterobjekte in Subobjekte aufweist, wobei die Clusterzerlegungseinrichtung bei Vorliegen eines Clusterobjektes eines von dessen Subobjekten der Sucheinrichtung zuführt.

Hier ist von Vorteil, daß mit der neuen Vorrichtung auch solche Proben untersucht werden können, in denen



sich Objekte zu Clusterobjekten zusammengelagert haben. Weiterhin ist von Vorteil, daß in dem Vorrat an Referenzobjekten nicht sämtliche möglichen Clusterobjekte vorhanden sein müssen, sondern daß ein Clusterobjekt in kleinere Subobjekte zerlegt wird, welche sich ohne großen Aufwand in die vorgegebene Zahl der Referenzobjekte einreihen lassen. Im allgemeinen ist es sogar so, daß das Subobjekt ein einzelnes Referenzobjekt oder Hauptobjekt oder zumindest ein wesentlicher Teil eines Hauptobjektes ist, so daß die vorgegebenen Referenzobjekte unmittelbar auch zur Bearbeitung von Proben verwendet werden können, in denen sich Clusterobjekte befinden.

In einer Weiterbildung ist es bevorzugt, wenn die Clusterzerlegungseinrichtung eine Clustererkennungseinrichtung zum Erkennen eines Clusterobjektes sowie eine Vorrichtung aufweist, die ein Subobjekt in einem Clusterobjekt erkennt, das Subobjekt von dem Clusterobjekt abspaltet und der Sucheinrichtung zuführt.

Diese Maßnahme ist insbesondere konstruktiv von Vorteil, weil die Clusterzerlegungseinrichtung sozusagen aus zwei Baugruppen aufgebaut werden kann.

Ferner ist es bevorzugt, wenn die Clusterzerlegungseinrichtung einen virtuell-optisch arbeitenden Differenzbildner aufweist, der von dem Clusterobjekt das zu einem identifizierten Subobjekt gehörende Referenzobjekt abzieht und so ein modifiziertes Clusterobjekt erzeugt, das der Clustererkennungseinrichtung zugeführt wird.

Diese vorteilhafte Maßnahme ermöglicht das sukzessive oder iterative "Abarbeiten" eines Clusterobjektes. Zunächst wird ein Subobjekt erkannt und dann wird das zu dem Subobjekt gehörende Hauptobjekt, das mehr Merkmale aufweisen kann als das Subobjekt selbst, von dem Clusterobjekt abgezogen, so daß das Clusterobjekt nicht nur um das Subobjekt sondern um weitere, noch nicht verglichene Subobjekte reduziert wird. Auf diese Weise muß nicht jedes einzelne Subobjekt des Clusterobjektes mit den Referenzobjekten verglichen werden, so daß die Bearbeitungszeit für ein Clusterobjekt deutlich verringert wird.

Ferner ist es bevorzugt, wenn die Clustererkennungseinrichtung eine Vorrichtung zur Bestimmung einer Länge des Objektes oder Clusterobjektes sowie eine Vorrichtung aufweist, die zur Bestimmung von quer zu der Länge verlaufenden Breiten des Objektes oder Clusterobjektes vorgesehen ist, und wenn ferner eine Qualifizierungseinrichtung vorgesehen ist, die anhand von Abweichungen der Breiten zueinander und anhand der Lage der Breiten zu der Länge erkennt, ob das lokalisierte Objekt ein Clusterobjekt ist.

Durch diese einfache und vorteilhafte Weise wird anhand von rein geometrischen Daten entschieden, ob ein Clusterobjekt vorliegt. Die Längenbestimmung ist nichts weiter als das Schlagen eines Umkreises um das gesamte Objekt, während die Breitenbestimmung ggf. nach einer entsprechenden Koordinatentransformation eine reine Differenzbildung zwischen jeweils zwei Punkten auf dem Umriß des Objektes darstellt. Wie bereits oben erwähnt, unterscheiden sich Clusterobjekte von einzelnen Objekten dadurch, daß die Breiten stark variieren und daß außerdem das Clusterobjekt dermaßen unregelmäßig geformt ist, daß die "Länge" sozusagen zumindest bereichsweise "außerhalb" des Umrisses des Clusterobjektes liegt.

Weiterhin ist es bevorzugt, wenn die Clustererkennungseinrichtung eine Vorrichtung aufweist, die anhand von Bewegungsvorgängen in Teilbereichen und/oder

von zusammenhängenden Bereichen gleicher Farbe erkennt, ob das lokalisierte Objekt ein Clusterobjekt ist.

Hier ist von Vorteil, daß auch innere Bewegungsvorgänge in dem Clusterobjekt, das beispielsweise aus Flocken und beweglichen Mikroorganismen bestehen kann, zur Clustererkennung verwendet werden. Dazu können auch Bereiche gleicher oder ähnlicher Farbe herangezogen werden, denn die Flocken und verschiedene Mikroorganismen weisen in den Bilddaten regelmäßig unterschiedliche Farben auf. So sind die Flocken oft gelblich, während z. B. Algen meist grünlich erscheinen.

Ferner ist es bevorzugt, wenn die Lokalisierungseinrichtung einen Umrißdetektor aufweist, der in den Bilddaten geschlossene Bereiche gleicher Echtfarbenbereiche detektiert, als Objekt erkennt und lokalisiert und danach in sich geschlossene Umriss ermittelt.

Diese Maßnahme ist insofern von Vorteil, als sowohl Objekte als auch Clusterobjekte in den Bilddaten immer einen in sich geschlossenen Umriß aufweisen. Auch hier ist es also anhand einfacher geometrischer Operationen möglich, ein Objekt oder Clusterobjekt zu lokalisieren. Zusätzlich können auch die Farbinformationen dazu verwendet werden, Objekte vor dem stets anders farbigen Hintergrund zu lokalisieren.

Bei diesem Ausführungsbeispiel ist es ferner bevorzugt, wenn die Bildaufnahmeverrichtung ein Bildaufnahmesystem mit einstellbarer optischer Vergrößerungseinrichtung sowie eine Verfahrenseinrichtung aufweist, durch welche die Probe relativ zu der Vergrößerungseinrichtung verfahrbar ist, derart, daß mittels des Bildaufnahmesystems von der Probe über ihr Volumen verteilt Bildfelder mit unterschiedlichen Vergrößerungseinstellungen aufnehmbar sind.

Durch diese Maßnahme wird die Probe vollständig abgetastet, wobei je nach gewählter Vergrößerung die Zahl der Bildfelder, die erforderlich ist, um das gesamte Volumen der Probe zu repräsentieren, variiert. Durch die Möglichkeit, verschiedene Vergrößerungseinstellungen zu wählen, können sowohl sehr kleine Objekte wie z. B. Bakterien (1 µm) als auch sehr große Objekte mit Abmaßen von mehreren mm detektiert werden.

In dieser Ausführungsform ist es bevorzugt, wenn die Lokalisierungseinrichtung eine Vorrichtung aufweist, die anhand der von dem Umrißdetektor in den Bildfeldern detektierten Umriss für ein sich über mehrere Bildfelder erstreckendes Objekt ein Überlagerungsbild erstellt.

Durch diese Maßnahme wird in einfacher und vorteilhafter Weise erreicht, daß auch bei Objekten, die sich an sich über mehrere Bildfelder erstrecken, und somit mehrfach mit Referenzobjekten verglichen werden müßten, ein einmaliger Vergleich mit den zur Verfügung stehenden Referenzobjekten ausreicht. Dies führt zu einem schnelleren Ablauf bei dem Erstellen der Artenliste.

Ferner ist es bevorzugt, wenn die Lokalisierungseinrichtung einen Bewegungsdetektor aufweist, der anhand der detektierten Umriss und/oder des Überlagerungsbildes erkennt, ob das lokalisierte Objektform- und/oder ortsveränderlich ist.

Diese Maßnahme ist insofern von Vorteil, als anhand bereits vorliegender Informationen, nämlich der detektierten Umriss und des Überlagerungsbildes, auf eine Beweglichkeit des lokalisierten Objektes geschlossen wird. Diese Information kann dann bei der Abspaltung von Subobjekten und bei der Eingrenzung der durchsuchenden Referenzobjekte verwendet werden.

Ferner ist es von Vorteil, wenn die Sucheinrichtung eine Vergleichereinrichtung aufweist, die in Abhängigkeit von Ausgangssignalen von Bewertungseinheiten für Echtfarbe, Bewegung, Größe und geometrische Form/Formveränderlichkeit des zu identifizierenden Objektes oder Subobjektes einen ausgewählten Teil der in einem Referenzobjektspeicher vorgegebenen Referenzobjekte auf virtuell-optische Weise nach dem Objekt/Subobjekt durchsucht.

Der Anwender hat erkannt, daß sich die in einer Probe vorkommenden Objekte durch eine entsprechende Kombination der Kriterien Farbe, Bewegung, Größe und geometrische Form in bestimmte Gruppen aufteilen lassen, so daß bei Vorliegen dieser Kriterien die Zahl der durchzusuchenden Referenzobjekte stark eingeschränkt werden kann. Auch dies führt zu einem schnelleren Ablauf bei der Erstellung der Artenliste.

Bei diesem Ausführungsbeispiel ist es weiterhin bevorzugt, wenn die Vorrichtung zum Erkennen und Abspalten von Subobjekten ein Clusterobjekt in Bereiche verschiedener Echtfarben und/oder Echtfarbkontraste zerlegt und diese Bereiche als Subobjekt behandelt.

Diese Maßnahme ist insofern von Vorteil, als anhand von bereits vorliegenden physikalischen bzw. geometrischen Daten entschieden wird, welche Bereiche eines Clusterobjektes Subobjekte sind. Es ist also lediglich erforderlich, die Bildfelder mit entsprechender Farbkontrastauflösung aufzunehmen, so daß aus den mit dem Bildaufnahmesystem gewonnenen Daten eine Zerlegung von Clusterobjekten in Subobjekte möglich ist.

Hier ist es ferner bevorzugt, wenn die Vorrichtung zum Erkennen und Abspalten von Subobjekten ein Clusterobjekt in Bereiche verschiedener Beweglichkeit, Form und/oder Größe zerlegt und diese Bereiche als Objekt behandelt.

Wie die vorhergehende Maßnahme ist auch diese insofern von Vorteil, als bereits ermittelte Größen und Kennwerte zur Zerlegung des Clusterobjektes herangezogen werden können. Diese Zerlegung ist damit durch einfache beispielsweise Hardwareschaltungen oder Mikroprogrammsteuerwerke möglich, so daß auch hier Zeit eingespart wird.

Weiterhin ist es bei dem neuen Verfahren und bei der neuen Vorrichtung bevorzugt, wenn für die Speicherung der Referenzobjekte ein Referenzobjektspeicher vorgesehen ist, in dem die Referenzobjekte in Form virtuell-optischer dreidimensionaler Vektorflächengraphikobjekte gespeichert sind.

Bei dieser Maßnahme ist es von Vorteil, daß den Referenzobjekten sozusagen eine Formveränderlichkeit beigegeben werden kann. Im Rahmen einer Vektorgraphik ist es nämlich möglich, die einzelnen Referenzobjekte derart abzuspeichern, daß bestimmte Freiheitsgrade vorgesehen werden können. Das Referenzobjekt muß also lediglich in einer Grundform vorgesehen sein, die sich im Rahmen zulässiger Freiheitsgrade verändern kann. Dadurch, daß der Vergleich auf virtuell-optischer Ebene erfolgt, können zunächst Suchobjekt und Referenzobjekt durch entsprechende mathematische Operationen in größt mögliche Übereinstimmung gebracht werden. Danach wird dann das Referenzobjekt, dem entsprechende Freiheitsgrade beigegeben sind, im Hinblick auf das Suchobjekt solange verändert, bis sich herausstellt, daß es sich an das Suchobjekt anpassen läßt oder nicht. Auf diese Weise können auch Objekte identifiziert werden, für die keine Wiederfindungserwartung besteht, deren konkrete Form also in dem Referenzdatenspeicher nur als Möglichkeit, nicht jedoch unmittel-

bar abrufbar, gespeichert ist. Es sei noch erwähnt, daß der Vergleich derart durchgeführt wird, daß die das Suchobjekt und das Referenzobjekt repräsentierenden verschiedenen Vektoren nach Betrag und Orientierung verglichen werden und daß beispielsweise bei einer Übereinstimmung in 90% der verglichenen Vektoren von der Zugehörigkeit des Suchobjektes zu der durch das gefundene Referenzobjekt repräsentierten Art auszugehen ist.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen und in Alleinstellung einsetzbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die Erfindung ist in der Zeichnung dargestellt und wird in der nachfolgenden Beschreibung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 die neue Vorrichtung zur Durchführung des neuen Verfahrens, in einer schematischen Gesamtansicht;

Fig. 2 die Steuer- und Auswerteeinheit der Vorrichtung nach Fig. 1, in einem Prinzipschaltbild;

Fig. 3 eine mit der Vorrichtung nach Fig. 1 zu untersuchende Probe, mit schematisch angedeuteten Objekten;

Fig. 4 eine Reihe von mit der Bildaufnahmeverrichtung nach Fig. 1 aufgenommenen Bildfeldern der Probe nach Fig. 3;

Fig. 5 die Lokalisierereinrichtung aus der Steuer- und Auswerteeinheit nach Fig. 2, in einem schematisierten Blockschaltbild;

Fig. 6 in einer detaillierteren Darstellung ein Bildfeld der Probe nach Fig. 3, mit einer Reihe von Objekten;

Fig. 7 die Identifizierungseinrichtung der Steuer- und Auswerteeinheit nach Fig. 2, in einem schematisierten Blockschaltbild;

Fig. 8 eines der Clusterobjekte aus dem Bildfeld nach Fig. 6, in einer vereinfachten Darstellung;

Fig. 9 die Clustererkennungseinrichtung der Identifizierungseinrichtung nach Fig. 7, in einem schematisierten Blockschaltbild; und

Fig. 10 die Sucheinrichtung der Identifizierungseinrichtung nach Fig. 7, in einem schematisierten Blockschaltbild.

Fig. 1 zeigt eine insgesamt mit 10 bezeichnete Vorrichtung zum Erstellen einer Artenliste für eine zwischen einem Objektträger 11 und einem Deckglas 12 befindliche flüssige Probe 13. Die Probe 13 weist ggf. form- und/oder ortsveränderliche Objekte 14a, 14b unterschiedlicher Arten auf. Die Vorrichtung 10 und das mit ihr durchzuführende Verfahren dienen zum Erstellen einer Artenliste und somit zur Ermittlung des ökologischen Zustandes der Probe 13, die beispielsweise einer Kläranlage oder einem natürlichen Gewässer entnommen sein kann.

Zur limnologischen Untersuchung ist häufig eine gesonderte Probennahme erforderlich, um Kleinstlebewesen wie Würmer, Insekten oder Schnecken (Größenordnung mm bis cm) erfassen und untersuchen zu können. Derartige ebenfalls flüssige Proben werden nicht auf einem Objektträger gehalten, sondern in einer Petrischale oder einem Uhrglas.

Die zu untersuchenden Probenräume sind also flüssig und in der Regel optisch durchsichtig. Wegen der hohen Formveränderlichkeit der unterschiedlichen Objekte 14 einerseits und der Tatsache, daß die Objekte 14 nicht immer vereinzelt vorliegen, sondern sich überdecken,

überlappen und miteinander verflechten können, andererseits, hat die Vorrichtung 10 gegenüber dem Objekt 14 in der konkret vorliegenden Form häufig keine Wiederfindungserwartung, es ist ihr so "nicht bekannt". Das auf der Vorrichtung 10 durchzuführende Verfahren ist daher wissenschaftsbasiert und selbstadaptierend.

Die Vorrichtung 10 weist eine Bildaufnahmeverrichtung 16 auf, zu der ein Bildaufnahmesystem 17 und eine einstellbare optische Vergrößerungseinrichtung 18 gehören. Weiterhin ist eine Verfahreinrichtung 19 angeordnet, über welche die Probe 13 relativ zu der Vergrößerungseinrichtung 18 verfahren werden kann. Dieses Verfahren erfolgt zumindest in zwei der drei Achsen X, Y und Z eines bei 20 angedeuteten Koordinatensystems.

In dem gezeigten Ausführungsbeispiel ist die Verfahreinrichtung 19 ein Kreuztisch 22, der in der X/Y-Ebene verfahren werden kann und ggf. eine Hubeinrichtung zur Veränderung seiner Z-Koordinate aufweist.

Die Vergrößerungseinrichtung 18 umfaßt ein Mikroskop 23, das verschiedene Vergrößerungsfaktoren einstellen kann. Durch entsprechendes Fokussieren des Mikroskopes 23 kann gleichfalls die Z-Ebene, welche von dem als CCD-Kamera 24 ausgebildeten Bildaufnahmesystem 17 erfaßt wird, eingestellt bzw. verändert werden.

Bei einer limnologischen Untersuchung von Kleinstlebewesen wird statt des Mikroskopes 23 eine in der Zeichnung nicht dargestellte Stereolupe verwendet, an die ebenfalls eine CCD-Kamera 24 angeschlossen ist. Je nach Größe der zu untersuchenden Objekte kann auch eine Bildaufnahmeverrichtung ohne vorgeschaltete Vergrößerungseinrichtung verwendet werden.

Weiterhin ist eine Steuer- und Auswerteeinheit 26 vorgesehen, die über eine Datenleitung 27 sowie eine Steuerleitung 28 mit der CCD-Kamera 24 verbunden ist. Auf diese Weise erfolgt eine gesteuerte Aufnahme und Übertragung von Bilddaten in die Steuer- und Auswerteeinheit 26. Die CCD-Kamera 24 ist außerdem über eine weitere Datenleitung 29 mit einem Massenspeicher 31 verbunden, der beispielsweise ein Videorekorder ist und zur Videoarchivierung der untersuchten Probe dient. Über eine Datenleitung 32 ist der Massenspeicher 31 ebenfalls mit der Steuer- und Auswerteeinheit 26 verbunden, die somit die Bilddaten entweder direkt von der CCD-Kamera 24 oder von dem Massenspeicher 31 abrufen kann.

Über eine Verbindungsleitung 33 ist ein Datenendgerät/Terminal 34 an die Steuer- und Auswerteeinheit 26 angeschlossen, um einem Benutzer Bilddaten von der Probe 13 anzuzeigen und um ihm die Möglichkeit zu geben, in den Auswerteprozess einzugreifen.

Weiterhin sind zwei Steuerleitungen 35 und 36 gestrichelt angedeutet, über welche die Steuer- und Auswerteeinheit 26 den Kreuztisch 22 sowie das Mikroskop 23 ansteuert.

Mit der insoweit beschriebenen Vorrichtung wird die Probe 13 nacheinander in X-, Y- und Z-Richtung abgetastet (gescannt), so daß am Ende des Abtastvorganges dreidimensionale Bilddaten zur Verfügung stehen. Einige der Objekte 14 sind — wie erwähnt — beweglich, so daß durch erneutes Scannen auch zusätzlich Informationen auf der Zeitachse gewonnen werden können. Die Qualität der Bilder wird dabei wesentlich durch das Objektiv des Mikroskopes 23 und durch die Auflösung/Digitalisierung des aufgenommenen Bildes bestimmt. Durch die einstellbare Vergrößerung des Mikroskopes 23 können Objekte 14 unterschiedlichster Größen erfaßt werden. Die Bilddaten repräsentieren dabei Echtbilder.

Gleichfalls ist es möglich, die Probe 13 einer Fluoreszenzuntersuchung zu unterziehen, indem sie mit einer in Fig. 1 nicht gezeigten Lichtquelle bestrahlt wird, wobei dieses Anregungslicht durch ein entsprechendes Filter in dem Mikroskop 23 wieder herausgefiltert wird.

Die Auswertung der erfaßten Bilddaten erfolgt in der in Fig. 2 detaillierter dargestellten Steuer- und Auswerteeinheit 26. Über die Datenleitungen 27 bzw. 32 werden Bilddaten entweder direkt von der CCD-Kamera 24 oder von dem Massenspeicher 31 in einen Bilddatenspeicher 38 geladen. Über dessen Ausgangsleitung 39 gelangen die Bilddaten in eine Lokalisierereinrichtung 40, die in noch näher zu beschreibender Weise die in den Bildern enthaltenen Objekte "wahrnimmt", d. h. erkennt und lokalisiert. Die derart lokalisierten Objekte werden über eine Objektdatenleitung 41 in einen Objektdatenspeicher 42 übertragen, von dem sie über seine Ausgangsleitung 43 zu einer Identifizierungseinrichtung 44 gelangen.

Die Identifizierungseinrichtung identifiziert das in dem Objektdatenspeicher 42 anstehende lokalisierte Objekt, d. h. sie bestimmt dessen Art, indem sie das Objekt 14 einer jeweils übereinstimmenden Art in einem noch zu beschreibenden Referenzobjektspeicher als Angehörigen zuordnet. Über eine Objektausgabeleitung 45 ist die Identifizierungseinrichtung 44 mit einer Zählereinrichtung 46 verbunden, die die identifizierten Objekte zählt und über eine Übergabeleitung 47 in eine bei 48 angedeutete Artenliste einträgt.

Ferner ist in Fig. 2 eine Bewertungseinrichtung 49 angedeutet, welche unter Verwendung zielangepaßter Methoden aus Ökologie, Biologie und/oder Etologie eine automatische Bewertung oder Interpretation der in die Artenliste 48 eingetragenen Daten vornimmt. Die Bewertungseinrichtung 49 liefert aufgrund der Interpretation der Artenliste 48 Aussagen über den ökologischen Zustand und ggf. eine Prognose über die Entwicklung der untersuchten Probe 13.

Die insoweit beschriebene Vorrichtung 10 und das auf ihr durchzuführende Verfahren sollen jetzt anhand der Fig. 3 bis 10 näher erläutert werden:

In Fig. 3 ist die Probe 13 aus Fig. 1 in vergrößertem Maßstab dargestellt. Durch gedachte Trennlinien 50 ist die Probe 13 in ein Raster von Bildfeldern 51 unterteilt, die nacheinander von der Bildaufnahmeverrichtung 16 aus Fig. 1 abgetastet werden. Zu diesem Zweck wird der Kreuztisch 22 an eine bestimmte X/Y-Koordinate gefahren und dann werden nacheinander in Z-Richtung übereinanderliegende Bildfelder 51 eines Stapels 52 von der CCD-Kamera 24 erfaßt, digitalisiert und als Bilddaten auf die Datenleitungen 27, 29 gegeben. Die Größe der einzelnen Bildfelder 51 richtet sich nach dem Vergrößerungsfaktor, auf den das Mikroskop 23 eingestellt ist. Der Abstand zwischen zwei übereinanderliegenden Bildfeldern 51a, 51d wird bestimmt durch die Schärfentiefe des Mikroskopes; je geringer dessen Schärfentiefe nämlich ist, desto mehr Bildfelder 51 in einem Stapel 52 müssen erfaßt werden, um die ganze Dicke der Probe 13 durchzumustern.

Wenn auf diese Weise ein Stapel 52 "abgearbeitet" wurde, verfährt der Kreuztisch 22 entweder in X- oder in Y-Richtung um die Breite/Länge eines Bildfeldes und das sukzessive Verfahren in Z-Richtung beginnt von neuem. Auf diese Weise wird die Probe 13 sozusagen mäanderförmig abgetastet. Selbstverständlich ist es auch möglich, die Bildfelder 51 in verschiedenen Z-Ebenen nicht in Form eines Stapels 52 anzuordnen, sondern jeweils um einen kleinen Betrag gegeneinander zu ver-

setzen, so daß über alles gesehen eine Zick-Zack-Verfahrline entsteht. Gegenüber dem mäanderförmigen Scannen müssen dann weniger Verfahrensschritte unternommen werden, um die gesamte Probe 13 abzutasten.

Selbstverständlich wird eine Probe 13 für unterschiedliche Vergrößerungsfaktoren des Mikroskopes 23 jeweils erneut abgetastet. Auf diese Weise werden zunächst die großen Objekte 14 mit geringem Vergrößerungsfaktor und dann mit steigender Vergrößerung immer kleinere Objekte 14 erkannt, lokalisiert und identifiziert werden, so daß sie in die Artenliste 48 eingetragen werden können.

In Fig. 3 ist zu erkennen, daß die Objekte 14 beliebige Lagen im Raum einnehmen können, so daß sie sich über mehrere Bildfelder 51 erstrecken können.

Wie in Fig. 4 zu sehen ist, erzeugt ein Objekt 14, das sich in einem Stapel 52 über mehrere übereinanderliegende Bildfelder 51c, 51d und 51e erstreckt, in jedem Bildfeld 51 ein anderes Muster 14', 14'' bzw. 14'''. Um das Objekt 14 identifizieren zu können, ist es zunächst erforderlich, zu entscheiden, über wieviele Bildfelder 51 sich ein Objekt 14 erstreckt. In dem in Fig. 4 gezeigten Beispiel erstreckt sich das Objekt 14 über die Bildfelder 51c-51e. Bedingt durch die Schärfentiefe des Mikroskopes 23 sind jeweils bestimmte Abschnitte des Objektes 14 in der Ebene des Bildfeldes 51 scharf abgebildet, wie dies in Fig. 4 mittels durchgezogener Linien angedeutet ist, während andere Abschnitte des Objektes 14 lediglich verschwommen zu sehen sind. Dies ist in Fig. 4 durch gestrichelte Linien angedeutet.

Um die einzelnen Bildfelder lagerichtig übereinander legen zu können, müssen die Bildfelder 51 zunächst ggf. gedreht und in X-, Y- und/oder Z-Richtung verschoben werden, um die Bewegung des jeweils betrachteten Objektes 14 zu berücksichtigen. Um zu erkennen, ob es sich in verschiedenen Bildfeldern 51a, 51e um ein Objekt 14 handelt, das sich zwischen den Aufnahmen der aufeinanderfolgenden Bildfelder 51 weiter bewegt hat, oder ob verschiedene Objekte 14, 14b betrachtet werden, können zusätzlich Informationen herangezogen werden, die aus Bilddaten stammen, die mit einem geringeren Vergrößerungsfaktor des Bildaufnahmesystems gewonnen wurden. Bei einem geringeren Vergrößerungsfaktor, also bei anderer Schärfentiefe, läßt sich nämlich leichter unterscheiden, ob es sich um zwei übereinanderliegende Objekte 14b, 14 oder um ein einziges, sich bewegendes Objekt 14 handelt. Bei dieser Überlagerung der einzelnen Bildfelder 51 fällt sozusagen nebenbei bereits eine Information darüber ab, ob es sich um ein sich bewegendes Objekt 14 handelt.

Da zwischen den einzelnen Aufnahmen der Bilder 51c-51e eine gewisse Zeitspanne vergeht, kann sich das Objekt 14 unterdessen bewegt haben, was jedoch anhand der Abweichung zwischen scharfen Konturen und verwischten Konturen in unterschiedlichen Z-Ebenen erkannt und ausgeglichen werden kann. Bei 51b ist ein weiteres Stapelbild des Objektes 14b angedeutet.

Legt man die einzelnen Bildfelder 51c-51e also lagerichtig übereinander, so gelangt man zu einem Stapelbild 53, das eine Art Höhenlinienbild 54 des Objektes 14 wiedergibt. Durch dieses Stapelbild 53 liegen die Objekte 14 jetzt in Form von dreidimensionalen Bilddaten vor, so daß sie in der Lokalisierungseinrichtung 40 erkannt und in der automatischen Identifizierungseinrichtung 44 identifiziert werden können. Dazu werden sie als Vektorgraphikobjekte abgelegt.

Selbstverständlich erstrecken sich die Objekte nicht nur in Z-Richtung durch mehrere Bildfelder 51 hindurch,

es ist durchaus möglich, in gleicher Weise, wie in Fig. 4 für die Z-Richtung gezeigt, auch in X- und/oder Y-Richtung eine derartige Erkennung eines Objektes 14 durchzuführen.

In Fig. 5 ist die zuständige Lokalisierungseinrichtung 40 detaillierter dargestellt. Die nacheinander auf der Ausgangsleitung 39 anstehenden Daten der einzelnen Bildfelder 51 gelangen zunächst in einen Umrißdetektor 56, der die Bilddaten nach in sich geschlossenen Umrissen und/oder Bereichen gleicher Farbe durchsucht, und so zu den scharfen (durchgezogenen) Konturen in den Bildfeldern 51a-51b aus Fig. 4 kommt. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, daß die Objekte 14 immer andersfarbig sind als der Hintergrund, diese sich also nicht nur durch den Kontrast sondern auch durch die Farbgebung von dem Hintergrund unterscheiden. Außerdem erkennt der Umrißdetektor 56 die verschwommenen Konturen der Objekte 14.

Der Umrißdetektor 56 legt zu diesem Zweck wie folgt ein Overlay-Fenster über die jeweiligen Objekte: Zunächst wird Punkt für Punkt eines jeden Bildfeldes 51 daraufhin abgefragt, ob seine Echtfarbe zu dem Hintergrundfarbbereich gehört, oder sich von diesem abhebt. Ist ein Bildpunkt (Pixel) gefunden, der nicht zum Hintergrund gehört, damit also Teil eines Objektes 14 ist, so wird dieser Punkt von einem virtuellen viereckigen Fenster überdeckt. Die Kanten des Fensters werden jetzt solange iterativ in alle vier Koordinatenrichtungen voneinander weggerichtet verschoben, bis die Kanten nur noch über Pixel liegen, die dem Hintergrundfarbbereich zuzuordnen sind. Da das Ausgangspixel ein Objekt-Pixel war, ist auf diese Weise sichergestellt, daß in dem so erzeugten Overlay-Fenster zumindest ein Objekt eingegrenzt ist.

Das so eingegrenzte Objekt 14 wird in ein Teilbild umkopiert, so daß die weiterhin zu bearbeitenden Daten deutlich reduziert worden sind. Nach dem Umkopieren wird das so in dem Original-Bilddatensatz erkannte Objekt (die Objekte) dadurch "gelöscht", daß die erkannten Objekt-Pixel in Hintergrund-Pixel umgewandelt werden. In den Original-Bilddaten sind somit nur noch "nicht wahrgenommene" Objekte enthalten, die auf gleiche Weise erkannt und umkopiert werden.

Während des Verschiebens der Overlay-Fensterkanten hat der Umrißdetektor 56 gleichzeitig jedes Objekt-Pixel als ein solches markiert und zusätzlich auf folgende Weise Pixel erkannt, die zum Umriß des jeweiligen Objektes 14 gehören: Jedes Pixel, das zumindest an einer seiner vier Seiten an ein Pixel mit Hintergrundfarbe grenzt, "gehört" zum Umriß des Objektes, während allseitig von Objekt-Pixeln umgebene Pixel "im Inneren" des Objektes liegen. Wegen des soeben beschriebenen Verfahrens ist außerdem gewährleistet, daß jede Kante des Overlay-Fensters zumindest an einer Stelle an das umschlossene Objekt angrenzt.

Nachdem die einzelnen Objekte in den unterschiedlichen Bildfeldern 51 so erkannt worden sind, gelangen die reduzierten Daten in einen Stapelbildüberlagerer 57, der die einzelnen Bildfelder 51 - wie anhand von Fig. 4 bereits beschrieben - so übereinander legt, daß die verschwommenen und die scharfen Konturen unterschiedlicher Bildfelder 51 übereinstimmen. Die derart zueinander ausgerichteten einzelnen Stapelbilder 51a-51e werden in dem Objektlokalisierer 58 als dreidimensionale Vektorgraphikdarstellungen abgelegt. Die Daten gelangen von hier in einen Bewegungsdetektor 59, der anhand der um zu einem Objekt 14 zu gelangenden erforderlichlich gewesenen Verschiebung der ein-

zelen Bildfelder 51 ermittelt, ob es sich um ein sich bewegendes Objekt handelt. Über die Ausgangsleitungen 60 und 61 werden die Daten des Stapelbildes 53 sowie die Bewegungsinformation einer Verknüpfungsschaltung 62 zugeführt, die diese Daten über die Objektdatenleitung 41 in den Objektdatenspeicher 42 gibt.

In Fig. 6 ist ausschnittsweise die Projektion eines von der Lokalisierereinrichtung 40 erzeugten Stapelbildes 53 dargestellt, wie es typischerweise für eine Probe 13 eines Belebtschlammes gefunden wird. Das Stapelbild 53 gibt eine kleine Flocke 64, ein Protozoen 65 sowie eine Fadenbakterie 66 mit zusätzlichem bakteriellem Aufwuchs 67 wieder. Weiterhin ist eine große Flocke 68 zu erkennen, an der eine weitere Fadenbakterie 69 sitzt. Ferner weist Fig. 6 eine Kolonie von drei Glockentierchen 70a, 70b, 70c auf, die einen gemeinsamen Stiel 71 haben, der mit seinem Fußpunkt 72 an der großen Flocke 68 sitzt. Während die Objekte 64 und 65 Einzelobjekte sind, die in der Identifizierungseinrichtung 44 problemlos identifiziert werden können, stellen die Objekte 66, 67 sowie 68, 69, 70, 71 ein Clusterobjekt 73 dar. Die Zahl der möglichen Clusterobjekte ist so astronomisch hoch, daß es nicht möglich ist, für diese Clusterobjekte Referenzdatenobjekte zu erzeugen. Die Identifizierungseinrichtung 44 muß daher jedes beliebige Clusterobjekt 73 so weiter verarbeiten können, daß es mit einer begrenzten Anzahl von vorgegebenen Referenzdaten eindeutig identifiziert werden kann. Hier ist noch zu bedenken, daß die Teilobjekte eines Clusterobjektes 73 sich zumindest teilweise gegenseitig überdecken bzw. überlappen können und ggf. auch miteinander verflochten sind.

In Fig. 7 ist gezeigt, daß die Identifizierungseinrichtung 44 aus diesem Grunde eine Clusterzerlegungseinrichtung 74 sowie eine Objekterkennungseinrichtung 75 aufweist. Die Daten eines lokalisierten Objektes gelangen über die Ausgangsleitung 43 in eine Clustererkennungseinrichtung 76, die jedes neu anstehende Objekt daraufhin überprüft, ob es ein Einzelobjekt oder ein Clusterobjekt 73 ist. Wie dies geschieht, wird noch erläutert.

Handelt es sich bei dem auf der Ausgangsleitung 43 anstehenden Objekt um ein Einzelobjekt, so überträgt die Clustererkennungseinrichtung 76 die Daten über seine Ausgangsleitung 77 in einen Vergleichsspeicher 78 der Objekterkennungseinrichtung 75. Handelt es sich dagegen um ein Clusterobjekt 73, so werden die Daten von der Clustererkennungseinrichtung 76 über seine Ausgangsleitung 79 in einen Clusterspeicher 80 geladen. Von dem Clusterspeicher 80 gelangen die Daten über eine Clusterdatenleitung 81 in eine Subobjekterkennungseinrichtung 82, die ein Clusterobjekt 73 in eine Reihe von Subobjekten zerlegt. Diese Zerlegung in Subobjekte erfolgt anhand weiterer Daten, die beispielsweise Aussagen über die geometrische Form bestimmter Bereiche des Clusters machen. Weiterhin werden die Farben der Clusterbereiche und/oder die unterschiedlichen Kontraste dazu herangezogen, das in Fig. 6 gezeigte Clusterobjekt 73 in einzelne Subobjekte zu zerlegen. Zurückkehrend zu Fig. 6 ist zu erkennen, daß beispielsweise die Glockentierchen 70 und ihre Stiele 71 unterschiedlich schraffiert sind, wodurch eine unterschiedliche Farbe angedeutet ist. Die Subobjekterkennungseinrichtung 82 spaltet jetzt beispielsweise das Glockentierchen 70a von dem Cluster 73 ab und übermittelt die Daten des Glockentierchens 70a über eine Subobjekt-Datenleitung 83 in den Vergleichsspeicher 78.

Der Vergleichsspeicher 78 enthält jetzt entweder die Daten eines Einzelobjektes 14 oder die Daten eines Subobjektes. Diese als "Suchobjekt" bezeichneten Daten gelangen über ein Suchobjekt-Datenleitung 84 in eine Sucheereinrichtung 85, die ihrerseits über eine Referenzobjekt-Datenleitung 86 mit einem Referenzdatenspeicher 87 in Verbindung steht. In dem Referenzdatenspeicher 87 sind in vektorieller, dreidimensionaler Darstellung sämtliche Objekte 14 enthalten, die in einer Probe 13 auftreten können.

Da viele der Objekte 14 formveränderlich sind, also beispielsweise eine andere geometrische Gestalt aufweisen, wenn sie ruhen oder sich bewegen, muß dies bei den Referenzobjektdaten berücksichtigt werden. Die Zahl der möglichen Formen, die ein einziges bewegliches Objekt 14 annehmen kann, ist jedoch so groß, daß diese nicht sämtlich vorhergesehen und abgespeichert werden können. Aus diesem Grunde erfolgt der Aufbau des Referenzdatenspeichers 87 derart, daß die Referenzobjekte in einer oder mehreren geometrischen Grundformen abgelegt werden. Zusätzlich zu dieser Grundform sind Freiheitsgrade abgespeichert, die die möglichen und zulässigen Bewegungen und Formveränderungen des jeweiligen Objektes berücksichtigen. Beim Vergleich zwischen dem Suchobjekt und den verschiedenen Referenzobjekten werden jetzt die Referenzobjekte im Hinblick auf das Suchobjekt solange verändert (im Rahmen ihrer zulässigen Freiheitsgrade) bis sie entweder zu dem Suchobjekt "passen", oder aber bis sich ergibt, daß keine Übereinstimmung zu erzielen ist. Dieser Vergleich ist ein virtuell-optischer Vorgang, bei dem aufgrund eines wissensbasierten Verfahrens (die zulässigen Freiheitsgrade eines Referenzobjektes sind abgespeichert) die Vektorgraphikdarstellung eines Objektes/Subobjektes mit einer zweidimensionalen Projektion eines virtuellen dreidimensionalen Vektorflächengraphikmodells des jeweils zu vergleichenden Referenzobjektes verglichen wird.

Die Sucheereinrichtung 85 vergleicht also jetzt die Daten, die auf der Suchobjekt-Datenleitung 84 anstehen, mit den vorhandenen Daten des Referenzdatenspeichers 87, bis das mit dem Suchobjekt übereinstimmende Referenzobjekt gefunden ist. Bei der Abspaltung in der Subobjekterkennungseinrichtung 82 kann es nun vorkommen, daß kein ganzes Objekt 14 von dem Cluster 73 abgespalten wird, sondern nur ein Teilobjekt. In dem Beispiel der Fig. 6 wird nicht ein aus Stiel 71a und Glockenteil 70a bestehendes Glockentierchen abgespalten, sondern nur das Teilobjekt 70a.

In dem Referenzdatenspeicher 87 findet sich jedoch zu dem Teilobjekt 70a ein Hauptobjekt 14 bestehend aus Teilobjekt 70a und Teilobjekt 71a. Dieses Hauptobjekt wird jetzt über eine Hauptobjekt-Datenleitung 88 an einen virtuell-optisch arbeitenden Differenzbildner 89 gegeben, der über eine Leitung 90 ebenfalls mit dem Clusterspeicher 80 in Verbindung steht. Der Differenzbildner 89 modifiziert jetzt das ursprünglich in dem Clusterspeicher 80 befindliche Clusterobjekt derart, daß es um das bereits erkannte Hauptobjekt reduziert wird.

Das modifizierte Clusterobjekt gelangt über die Leitung 91 zurück in die Clustererkennungseinrichtung 76, wo die nun anstehenden Bilddaten entweder erneut als Cluster erkannt werden und in den Clusterspeicher 80 eingeschrieben werden, oder aber als Einzelobjekt erkannt werden und somit unmittelbar in den Vergleichsspeicher 78 gegeben werden.

Selbstverständlich wird jedes erkannte Hauptobjekt über die Objektausgabeleitung 45 an die Zähl- und

tung 46 gemeldet.

Hier sei erwähnt, daß die in dem Referenzdatenspeicher 87 vorhandenen Referenzobjekte von Fall zu Fall um weitere neu auftretende oder neu zu bestimmende Objekte erweitert wird, die Vorrichtung 10 ist also selbstadaptierend.

Anhand von Fig. 8 wird jetzt beschrieben, nach welchen Kriterien die Clustererkennungseinrichtung 76 ermittelt, ob es sich bei den auf der Ausgangsleitung 43 anstehenden Daten um ein einzelnes Objekt 14 oder um ein Clusterobjekt 73 handelt.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in Fig. 8 die Glockentierchen 70b und 70c aus Fig. 6 weggelassen. Die Farben und der Kontrast der einzelnen Elemente des Clusters 73' aus Fig. 8 spielen in diesem Beispiel für die Erkennung, ob es sich um ein Cluster handelt, ebenfalls keine Rolle. Das Clusterobjekt 73 ist in Fig. 8 lediglich durch seinen bei 92 angedeuteten Umriß repräsentiert. Dieser Umriß des Clusterobjektes 73 wurde bereits mit Hilfe des Umrißdetektors 56 — siehe Fig. 5 — ermittelt.

Die Clustererkennungseinrichtung 76 legt jetzt einen Umkreis um das Clusterobjekt und bestimmt so seine bei 93 angedeutete Länge, seine maximale Ausdehnung in der X/Y-Ebene. Dies geschieht beispielsweise, indem zwischen sämtlichen Koordinatenpaaren (X/Y) der Abstand bestimmt wird und dann der maximale Abstand als Länge 93 in die Bilddaten aufgenommen wird.

Als nächstes wird die Breite des Clusterobjektes 73 bzw. des Objektes 14 senkrecht zu der Länge 93 bestimmt. Dies geschieht ebenfalls durch eine Abstandsbestimmung zwischen den entsprechenden Koordinaten, einige Breiten sind bei 94a, 94b in Fig. 8 angedeutet. Es ist zu erkennen, daß das Clusterobjekt 73 teilweise Breiten 94c aufweist, die keinen Schnittpunkt mit der Länge 93 aufweisen. Dies ist ein Indiz für eine unregelmäßige Form des Objektes 14 bzw. des Clusterobjektes 73. Nach jeweils festzulegenden Kriterien ermittelt die Clustererkennungseinrichtung 76 aus der Variation der verschiedenen Breiten 94a—94c sowie aus der Tatsache, wie oft die Länge 93 "außerhalb" des Objektes 14 bzw. des Clusterobjektes 73 liegt, ob es sich bei dem vorliegenden Datensatz um ein Clusterobjekt 73 handelt.

Die Clustererkennungseinrichtung 76 ist in Fig. 9 detaillierter dargestellt. Die auf der Ausgangsleitung 43 anstehenden Objektdaten eines lokalisierten Objektes werden über eine innere Datenverzweigung 95 einzelnen Baugruppen der Clustererkennungseinrichtung 76 zugeführt. Über einen Umschalter 96 wird dabei entweder die Ausgangsleitung 43, die von dem Objektdatenspeicher 42 kommt, oder die Leitung 91, die Informationen eines modifizierten Clusterobjektes 73 enthält, auf die innere Datenverzweigung 95 geschaltet.

Diese Daten gelangen in eine Vorrichtung 97 zur Längenbestimmung, eine Vorrichtung 98 zur Breitenbestimmung und eine Qualifizierungseinrichtung 99, die z. B. aus dem Verhältnis Länge zu Breite ermittelt, ob es sich bei dem zu bewertenden Objekt 14 um ein einzelnes Objekt 14 oder um ein Clusterobjekt 73 handelt. Die Funktionsweise der Vorrichtungen 97, 98 und der Qualifizierungseinrichtung 99 wurde bereits anhand von Fig. 8 erläutert.

Die Qualifizierungseinrichtung 99 gibt die anstehenden Daten entweder auf die Ausgangsleitung 77, wenn es sich um ein einzelnes Objekt 14 handelt, oder auf die Ausgangsleitung 79, wenn es sich um ein Clusterobjekt 73 handelt.

Die Clustererkennungseinrichtung 76 weist weiterhin

eine Vorrichtung 100 auf, die anhand von Bewegungsvorgängen in Teilbereichen eines Clusters und/oder von zusammenhängenden Bereichen gleicher Echtfarben erkennt, ob das lokalisierte Objekt 14 ein Clusterobjekt 73 ist.

Als letztes soll erläutert werden, wie die Sucheinrichtung 85 die auf der Suchobjekt-Datenleitung 84 anstehenden Suchobjekte mit den auf der Referenzdatenleitung 86 zugänglichen Referenzdaten des Referenzdatenspeichers 87 vergleicht. Dies geschieht anhand von Fig. 10.

Die Sucheinrichtung 85 weist zu diesem Zweck eine virtuelloptisch arbeitende Vergleichereinrichtung 101 auf, die nacheinander die zur Verfügung stehenden Daten des Referenzdatenspeichers 87 abfragt und mit den Suchobjektdaten auf der Suchobjekt-Datenleitung 84 vergleicht. Damit nicht bei jedem Suchobjekt sämtliche Referenzobjekte durchgemustert werden müssen, umfaßt die Sucheinrichtung 85 beispielsweise vier Bewertungseinheiten 102, 103, 104 und 105, welche die Suchobjekte nach Farbe, Bewegung, Größe und geometrischer Form bzw. Formveränderlichkeit qualifizieren. Diese Informationen führen zu Entscheidungskriterien, die es der Vergleichereinrichtung 101 ermöglichen, nur einen kleinen Satz der gesamten zur Verfügung stehenden Referenzobjekte tatsächlich mit dem jeweiligen Suchobjekt zu vergleichen.

Ist das Suchobjekt beispielsweise in seiner längsten Ausdehnung kleiner als zwei  $\mu\text{m}$ , werden nur die in dem Referenzdatenspeicher 87 gespeicherten Bakterien mit dem Suchobjekt verglichen. Hat das Suchobjekt dagegen eine ausgefallene, seltene Farbgebung, so werden nur die mit dem entsprechenden Farbcode identifizierten Referenzobjekte mit dem Suchobjekt verglichen. Entsprechende Überlegungen lassen sich auch für Bewegung und geometrische Form anstellen.

Je nachdem, welches der hier beispielhaft angeführten vier Kriterien Farbe, Bewegung, Größe und geometrische Form sich als am relevantesten erweist, durchsucht die Vergleichereinrichtung 101 bestimmte Bereiche des Referenzdatenspeichers 87. Auf diese Weise läßt sich eine sehr viel schnellere Identifizierung des Objektes und in rekursiver Weise damit eines Clusters 73 durchführen.

Die Bewertungseinrichtungen 102—105 stellen sozusagen einen Merkmalsatzvergleich dar, welcher aufgrund von aus den Bilddaten extrahierter Merkmale eine Art morphologische Klassifizierung der Objekte durchführt. Wegen der hohen Formverschiedenheit der einzelnen Objekte ein- und derselben Art, ist eine derartige morphologische Klassifizierung aufgrund von Grobmerkmalen jedoch nur bis zu einem bestimmten Grad möglich. Danach erfolgt — wie bereits oben beschrieben — in der Vergleichereinrichtung 101 ein quasi-visueller Vergleich, ein Vergleich auf der Basis virtueller dreidimensionaler Vektorgraphik. Dabei werden die Vektoren von Such- und Referenzobjekt hinsichtlich Betrag (Länge) und Raumwinkel (Orientierung im Raum) miteinander verglichen. Die Referenzobjekte sind dabei formveränderlich angelegt, sie werden also im Hinblick auf das jeweilige Suchobjekt solange verändert, bis sie "passen". Auf diese Weise können alle nicht ohne weiteres beschreibbaren Merkmale dennoch berücksichtigt werden, da sie in der feinstspezifischen Struktur des Referenzobjektes implementiert sind. Eine vollständige Objektidentifizierung anhand beschreibender Merkmale ist auch deshalb nicht möglich, weil sich die unterschiedlichen Arten zum Teil durch Merkmals-

sätze voneinander unterscheiden, die nur schwer in Algorithmen, sei es auf Hardware- oder auf Software-Ebene erfassen lassen.

Ist das Suchobjekt als Teil eines Hauptobjektes erkannt worden, so wird das entsprechende Hauptobjekt von der Vergleichereinrichtung 101 in einen Hauptobjektspeicher 106 geladen, der über die Hauptobjekt-Datenleitung 88 mit dem Differenzbildner 89 in Verbindung steht.

Lediglich der Vollständigkeit halber sei abschließend erwähnt, daß die diversen in den Fig. 2, 4, 5, 7, 9 und 10 durch rechteckige Kästchen angedeuteten Baugruppen in beliebiger Kombination ganz oder auch zum Teil entweder durch reine Hardware-Schaltungen/Mikroprogrammsteuerwerke, Rechenschaltungen oder programmgesteuerte Datenverarbeitungseinheiten realisiert sein können. Weiterhin ist es selbstverständlich, daß die einzelnen Speicher entweder getrennte Speicher sein können oder aber teilweise überlappende Bereiche eines einzigen Speichers sein können.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Erstellen einer Artenliste (48) für eine flüssige Probe (13) mit ggf. form- und/oder ortsveränderlichen sich z. T. gegenseitig überdeckenden oder überlappenden Objekten unterschiedlicher Arten zur Ermittlung des ökologischen Zustandes der Probe (13), mit den Schritten:
  - a) Optisches Erfassen der Probe (13) als Folge von Bilddaten;
  - b) Erkennen und Lokalisieren der Objekte (14) in den erfaßten Bilddaten;
  - c) Automatisches Identifizieren der lokalisierten Objekte (14) durch automatisches Vergleichen des jeweiligen lokalisierten Objektes (14) mit einer bestimmten Gruppe von Referenzobjekten, die aufgrund von aus den Bilddaten gewonnenen Grobmerkmalen des lokalisierten Objektes (14) aus einer größeren Gruppe von Referenzobjekten ausgewählt werden;
  - d) Zählen der identifizierten Objekte (14) nach den jeweiligen Arten; und
  - e) Eintragen der gezählten Objekte (14) in die Artenliste (48).
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:
  - f) Automatische, interpretierende Bewertung der Eintragungen in der Artenliste unter Verwendung zielangepaßter Methoden aus Ökologie, Biologie und Ethologie.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Schritt des automatischen Identifizierens das jeweils lokalisierte Objekt folgenden Verfahrensschritten unterzogen wird:
  - c1) Automatisches Erkennen des Vorliegens eines aus mehreren zusammenhängenden sich ggf. überlappenden, miteinander verflochtenen Objekten (14) bestehenden Clusterobjektes (73);
  - c2) Abspalten eines Subobjektes von dem Clusterobjekt (73); und
  - c3) Vergleichen des Subobjektes oder des lokalisierten Objektes mit Referenzobjekten (Schritt c) aus Anspruch 1).
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das automatische Identifizieren die weiteren Schritte umfaßt:

- c4) Auswählen des zu einem identifizierten Subobjekt gehörenden Referenzobjektes;
- c5) Erzeugen eines modifizierten Clusterobjektes (73) durch Vermindern des Clusterobjektes (73) um das ausgewählte Referenzobjekt; und
- c6) Behandeln des modifizierten Clusterobjektes (73) wie ein lokalisiertes Objekt (14) (Schritt c1).

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß das automatische Erkennen des Vorliegens eines Clusterobjektes (73) die Schritte umfaßt:

- c1a) Bestimmung einer Länge (73) oder maximalen Ausdehnung des lokalisierten Objektes (14);
- c1b) Bestimmung von quer zu der Länge (93) verlaufenden Breiten (94) des lokalisierten Objektes (14); und
- c1c) Bewerten der Abweichungen der Breiten (94a, 94b, 94c) untereinander sowie der Lage der Breiten (94) zu der Länge (93), um das Vorliegen eines Clusterobjektes (73) zu bestimmen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt des Erkennens und Lokalisierens der Objekte (14) die automatische Überführung eines Objektes (14) in ein Teilbild und danach das automatische Detektieren von in sich geschlossenen Umrissen (92) umfaßt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt des optischen Erfassens der Probe (13) das automatische Aufnehmen von Bildfeldern (51) unterschiedlicher Vergrößerung umfaßt, wobei von der Probe (13) je Vergrößerung über ihr Volumen verteilte Bildfelder (51) aufgenommen werden.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt des Lokalisierens das Zusammenfassen mehrerer Bildfelder (51), über die sich ein Objekt (14) erstreckt, zu einem Überlagerungsbild (53) umfaßt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt des Lokalisierens der Objekte (14) das Detektieren von Bereichen gleicher oder ähnlicher Echtfarbe, Echtfarbmuster oder Echtfarbbereiche umfaßt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Vergleich zwischen Objekt bzw. Subobjekt einerseits und Referenzobjekt andererseits auf der Basis dreidimensionaler virtueller Vektorgraphikdarstellungen erfolgt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das automatische Erkennen eines Clusterobjektes (73) das Zerlegen des Clusterobjektes (73) in Bereiche verschiedener Echtfarben, Echtfarbmuster und/oder Echtfarbkontraste umfaßt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Clusterobjekt in Bereiche unterschiedlicher Bewegung, geometrischer Form und Größe zerlegt wird.

13. Vorrichtung zum Erstellen einer Artenliste (48) für eine flüssige Probe (13) mit ggf. form- und/oder ortsveränderlichen, sich z. T. gegenseitig überdeckenden oder überlappenden Objekten (14) unterschiedlicher Arten zur Ermittlung des ökologischen



Zustandes der Probe (13), mit:

- a) einer Bildaufnahmeverrichtung (16) zum optischen Erfassen der Probe (13) als Folge von Bilddaten;
  - b) einer Lokalisierereinrichtung (40) zum Erkennen und Lokalisieren der Objekte (14) in den erfaßten Bilddaten;
  - c) einer Identifizierungseinrichtung (44) zum automatischen Identifizieren der lokalisierten Objekte (14); und
  - d) einer Zähleinrichtung (46) zum Zählen der identifizierten Objekte (14) nach den jeweiligen Arten sowie zum Eintragen der gezählten Objekte (14) in die Artenliste (48), wobei die Identifizierungseinrichtung (44) eine Sucheinstellung (85) umfaßt, die die lokalisierten Objekte (14) mit einer Gruppe von Referenzobjekten vergleicht, die sich aufgrund von aus den Bilddaten gewonnenen Grobmerkmalen des lokalisierten Objektes (14) aus einer größeren Gruppe von Referenzobjekten ergeben, und ein identifiziertes Objekt (14) als solches an die Zähleinrichtung (46) meldet.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Bewertungseinrichtung (49) zur automatischen, interpretierenden Bewertung der Eintragung in die Artenliste (48) unter Verwendung zielangepaßter Methoden aus Ökologie, Biologie und Ethologie umfaßt.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sucheinstellung (85) eine virtuelloptischen Vergleich (101) umfaßt für den Vergleich zwischen Objekt und Referenzobjekt auf der Basis dreidimensionaler virtueller Vektorgraphikdarstellungen.
16. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierungseinrichtung (44) eine Clusterzerlegungseinrichtung (74) zum Erkennen von aus mehreren zusammenhängenden, sich ggf. überlappenden oder miteinander verflochtenen Objekten (14) bestehenden Clusterobjekten (73) und zum Zerlegen der Clusterobjekte (73) in Subobjekte aufweist, wobei die Clusterzerlegungseinrichtung (74) bei Vorliegen eines Clusterobjektes (73) eines von dessen Subobjekten der Sucheinstellung (85) zuführt.
17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Clusterzerlegungseinrichtung (74) eine Clustererkennungseinrichtung (76) zum Erkennen eines Clusterobjektes (73) sowie eine Vorrichtung (82) aufweist, die ein Subobjekt in einem Cluster (73) erkennt, das Subobjekt von dem Cluster (73) abspaltert und der Sucheinstellung (85) zuführt.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Clusterzerlegungseinrichtung (74) einen virtuell-optisch arbeitenden Differenz-Bildner (89) aufweist, der von dem Clusterobjekt (73) das zu einem identifizierten Subobjekt gehörende Referenzobjekt abzieht und so ein modifiziertes Clusterobjekt (73) erzeugt, das der Clustererkennungseinrichtung (76) zugeführt wird.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Clustererkennungseinrichtung (76) eine Vorrichtung (97) zur Bestimmung einer Länge (93) des Objektes (14) oder Clusterobjektes (73) sowie eine Vorrichtung (98) aufweist, die zur Bestimmung von quer zu der Län-

- ge (93) verlaufenden Breiten (94a, 94b, 94c) des Objektes (14) oder Clusterobjektes (73) vorgesehen ist, und daß ferner eine Qualifizierungseinrichtung (99) vorgesehen ist, die anhand von Abweichungen der Breiten (94) zueinander und anhand der Lage der Breiten (94) zu der Länge (93) erkennt, ob das lokalisierte Objekt (14) ein Clusterobjekt (73) ist.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Clustererkennungseinrichtung (76) eine Vorrichtung (100) aufweist, die anhand von Bewegungsvorgängen in Teilbereichen und/oder von zusammenhängenden Bereichen gleicher Farbe erkennt, ob das lokalisierte Objekt (14) ein Clusterobjekt (73) ist.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Lokalisierereinrichtung (40) einen Umrißdetektor (56) aufweist, der in den Bilddaten geschlossene Bereiche gleicher Echtfarbenbereiche detektiert als Objekt (14) erkennt und lokalisiert und danach in sich geschlossene Umrisse (92) ermittelt.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Bildaufnahmeverrichtung (16) ein Bildaufnahmesystem (17) mit einstellbarer optischer Vergrößerungseinrichtung (18) sowie eine Vorrichtung (19) aufweist, durch welche die Probe (13) relativ zu der Vergrößerungseinrichtung (18) verfahrbar ist, derart, daß mittels des Bildaufnahmesystems (17) von der Probe (13) über ihr Volumen verteilte Bildfelder (51) mit unterschiedlichen Vergrößerungseinstellungen aufnehmbar sind.
23. Vorrichtung nach den Ansprüchen 21 und 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Lokalisierereinrichtung (40) eine Vorrichtung (57, 58) aufweist, die anhand der von dem Umrißdetektor (56) in den Bildfeldern (51) detektierten Umrisse (92) für ein sich über mehrere Bildfelder (51) erstreckendes Objekt (14) ein Überlagerungsbild (53) erstellt.
24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Lokalisierereinrichtung (40) einen Bewegungsdetektor (59) aufweist, der anhand der detektierten Umrisse (92) und/oder des Überlagerungsbildes (53) erkennt, ob das lokalisierte Objekt (14) form- und/oder ortsveränderlich ist.
25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Sucheinstellung (85) eine Vergleichereinrichtung (101) aufweist, die in Abhängigkeit von Ausgangssignalen von Bewertungseinheiten (102, 103, 104, 105) bspw. für Echtfarbe, Bewegung, Größe und geometrische Form/Formveränderlichkeit des zu identifizierenden Objektes (14) oder Subobjektes einen ausgewählten Teil der in einem Referenzobjektspeicher (87) vorgegebenen Referenzobjekte auf virtuell-optische Weise nach dem Objekt/Subobjekt durchsucht.
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung (82) zum Erkennen und Abspalten von Subobjekten ein Clusterobjekt (73) in Bereiche verschiedener Echtfarben und/oder Echtfarbkontraste zerlegt, und diese Bereiche als Subobjekt behandelt.
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung (82) zum Erkennen und Abspalten von Subobjekten ein Clusterobjekt (73) in Bereiche verschiedener Bewegung, Form und/oder Größe zerlegt, und



diese Bereiche als Subobjekt behandelt.

28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß für die Speicherung der Referenzobjekte ein Referenzobjektspeicher (87) vorgesehen ist, in dem die Referenzobjekte in Form virtuell-optischer dreidimensionaler Vektorflächengraphikobjekte gespeichert sind.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

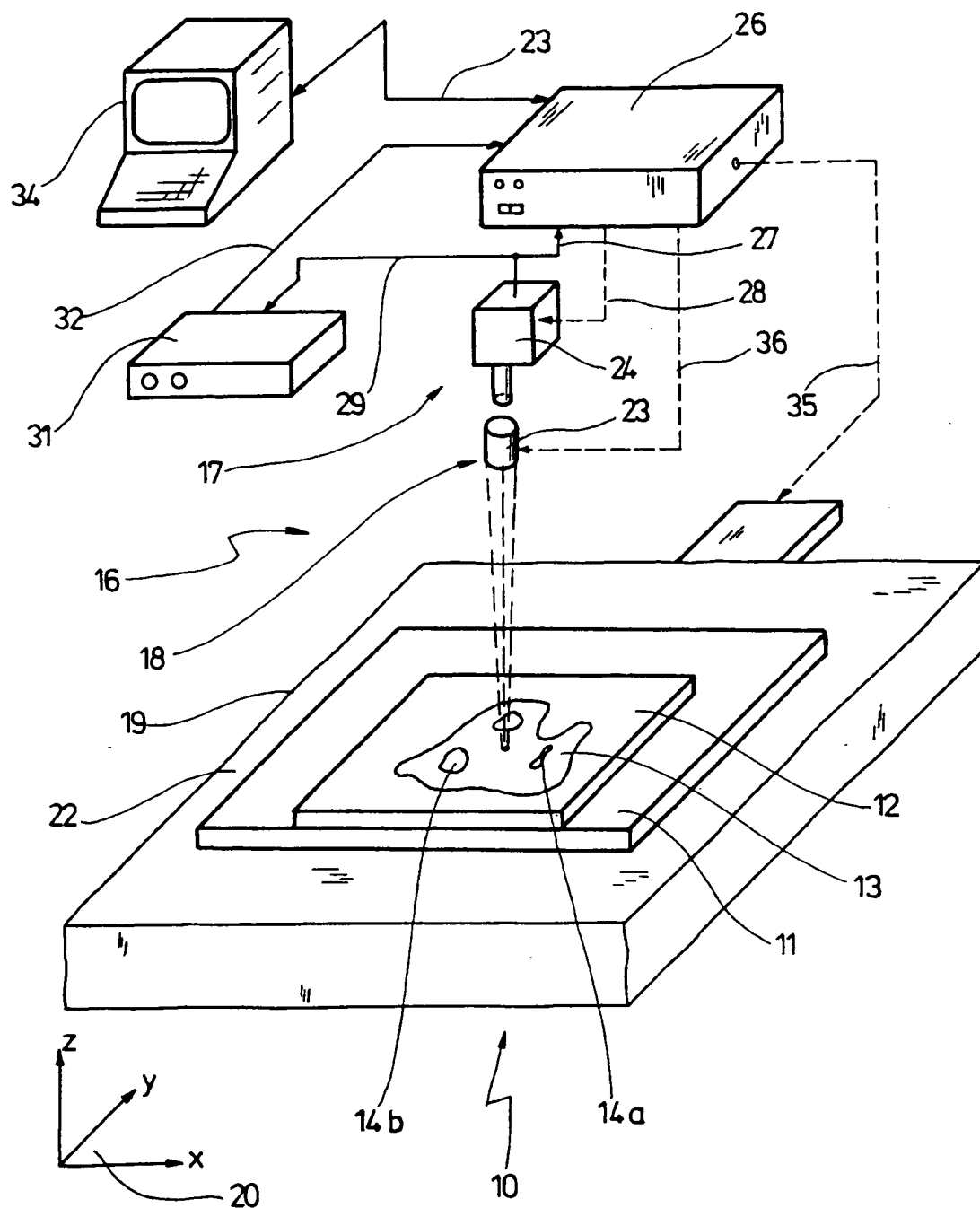


Fig. 1

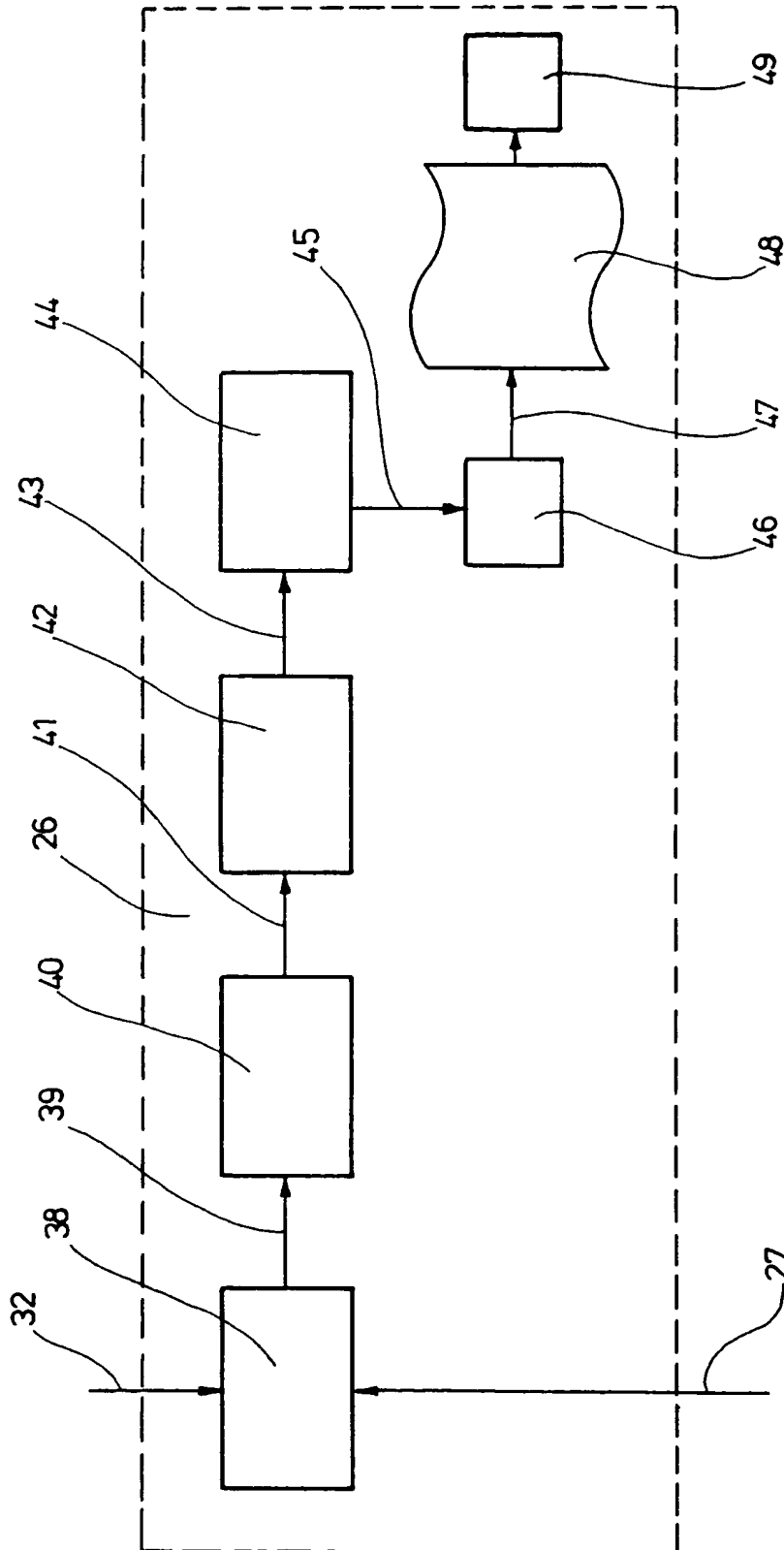


Fig. 2

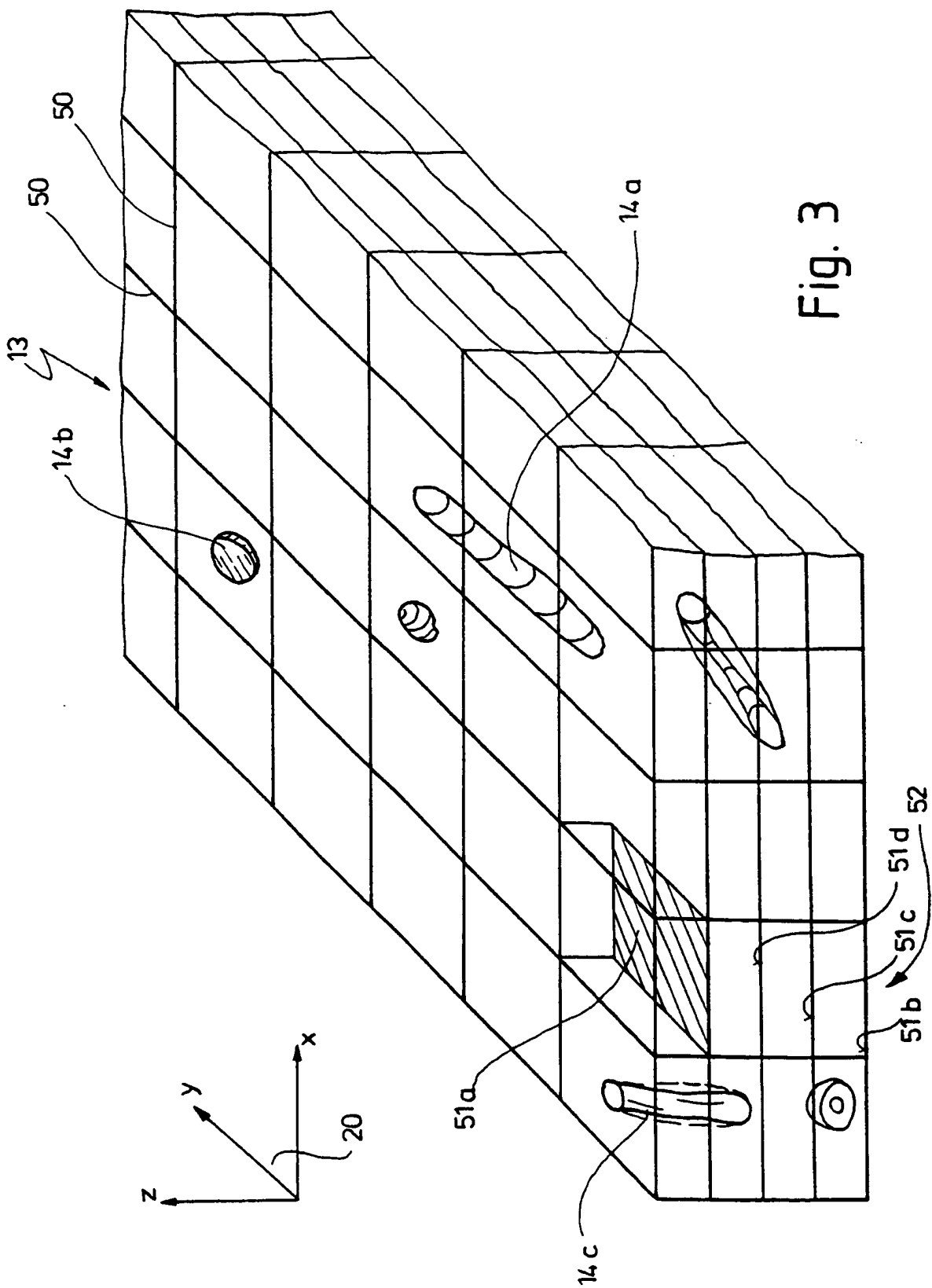


Fig. 3

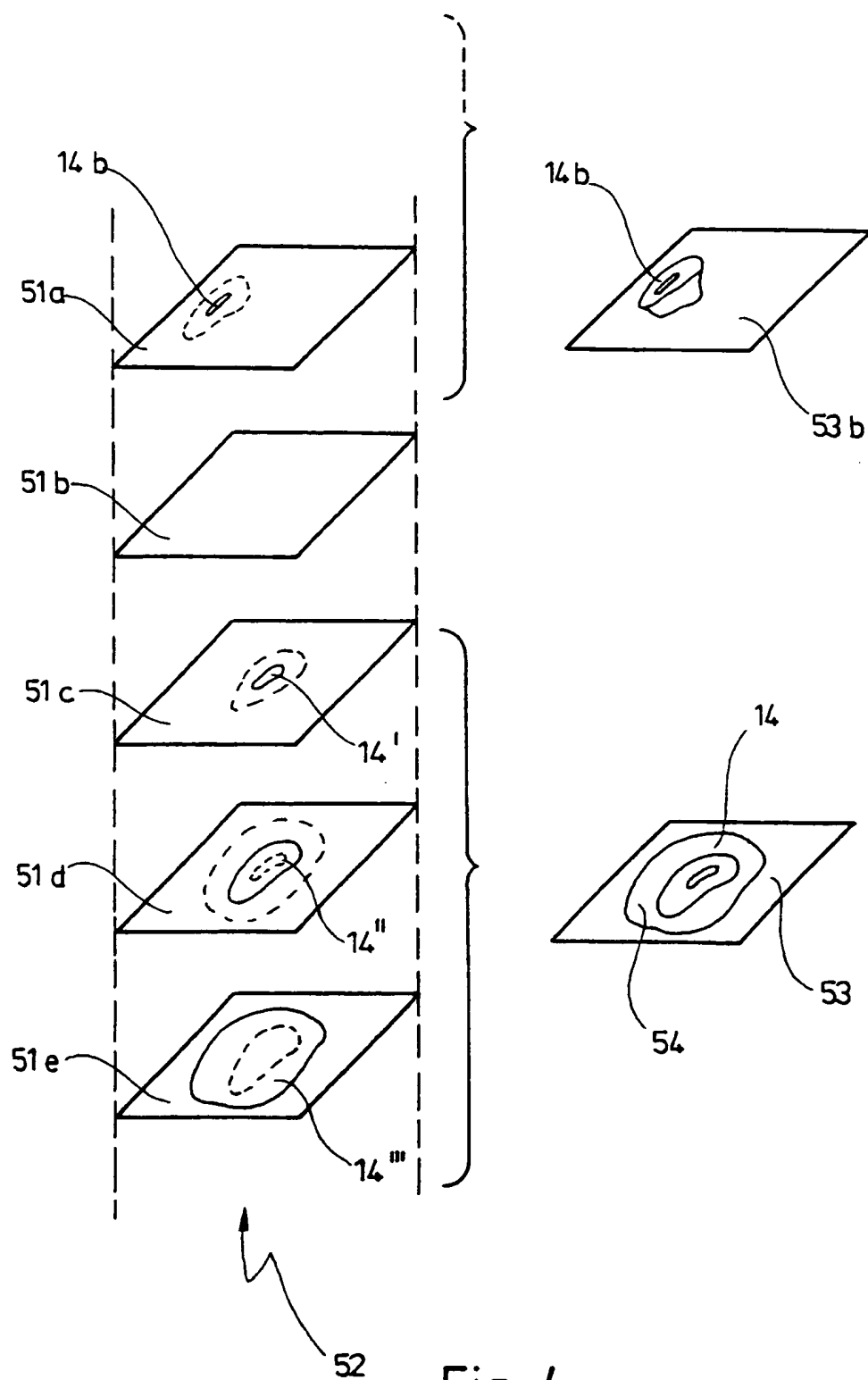


Fig. 4

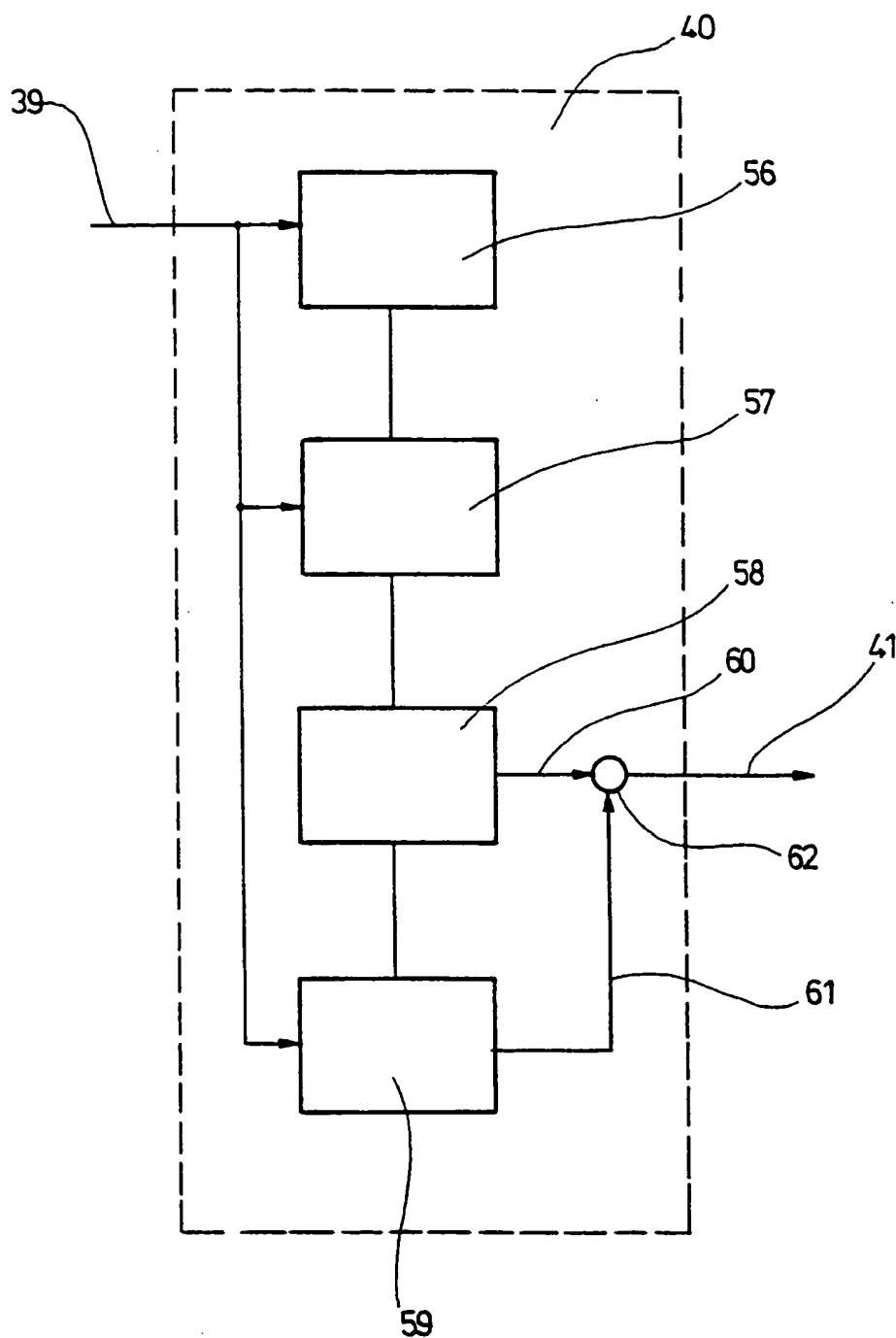


Fig. 5

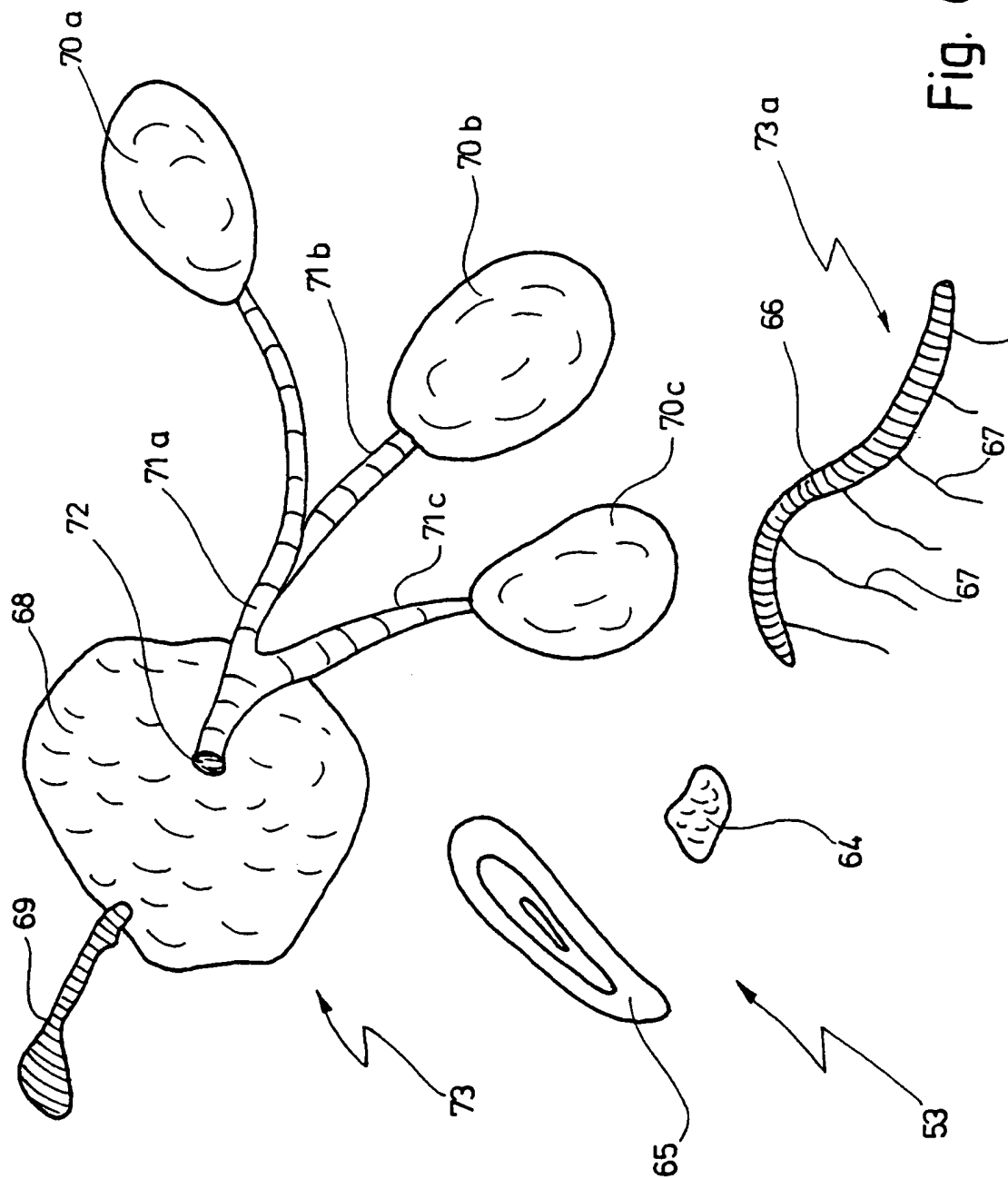


Fig. 6

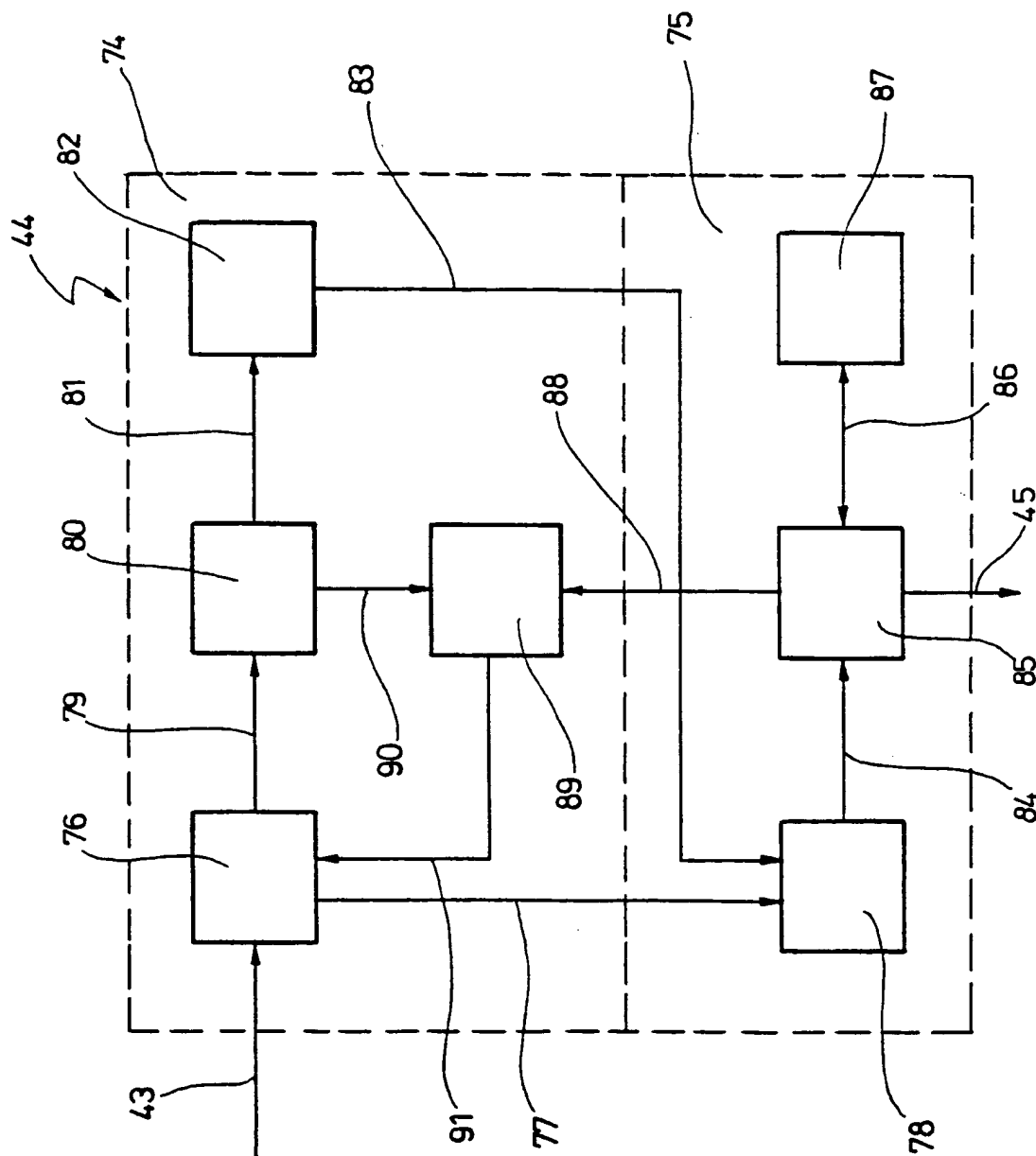


Fig. 7



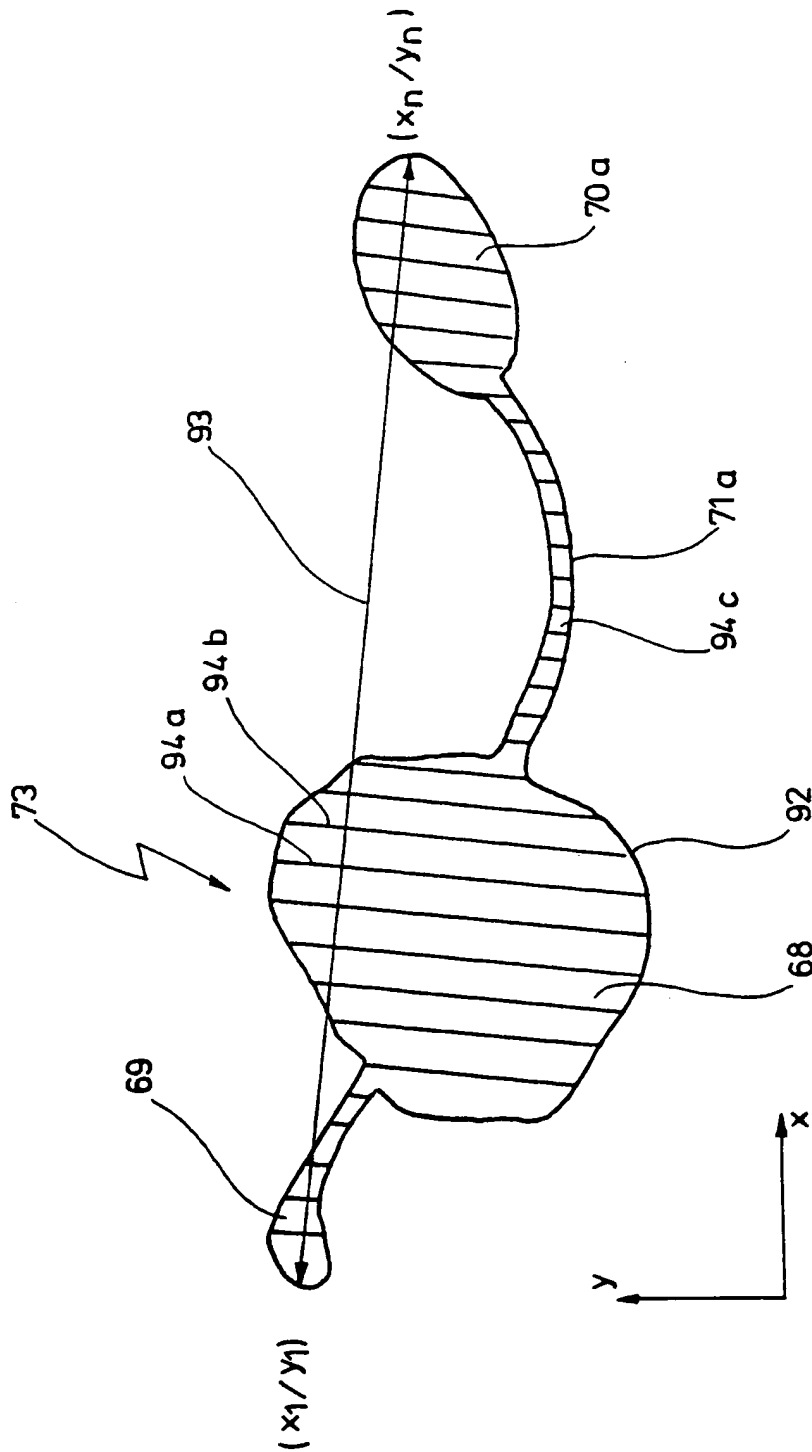


Fig. 8

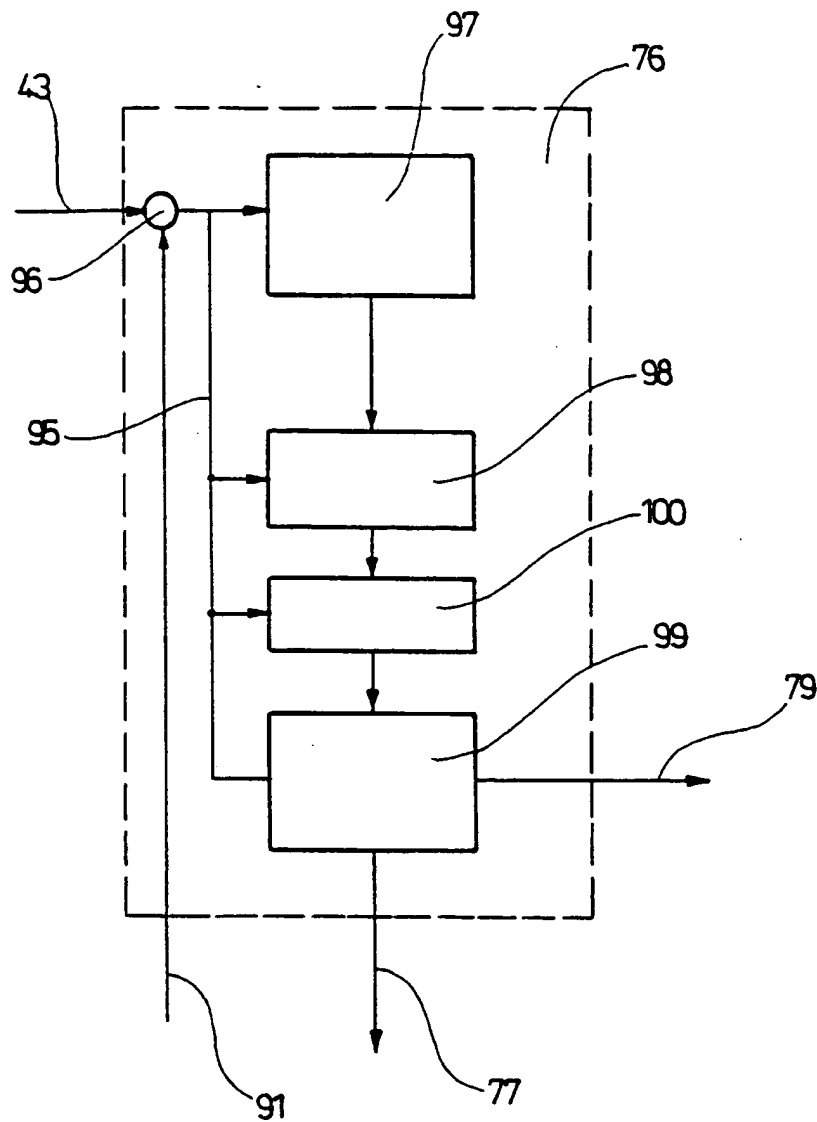


Fig. 9

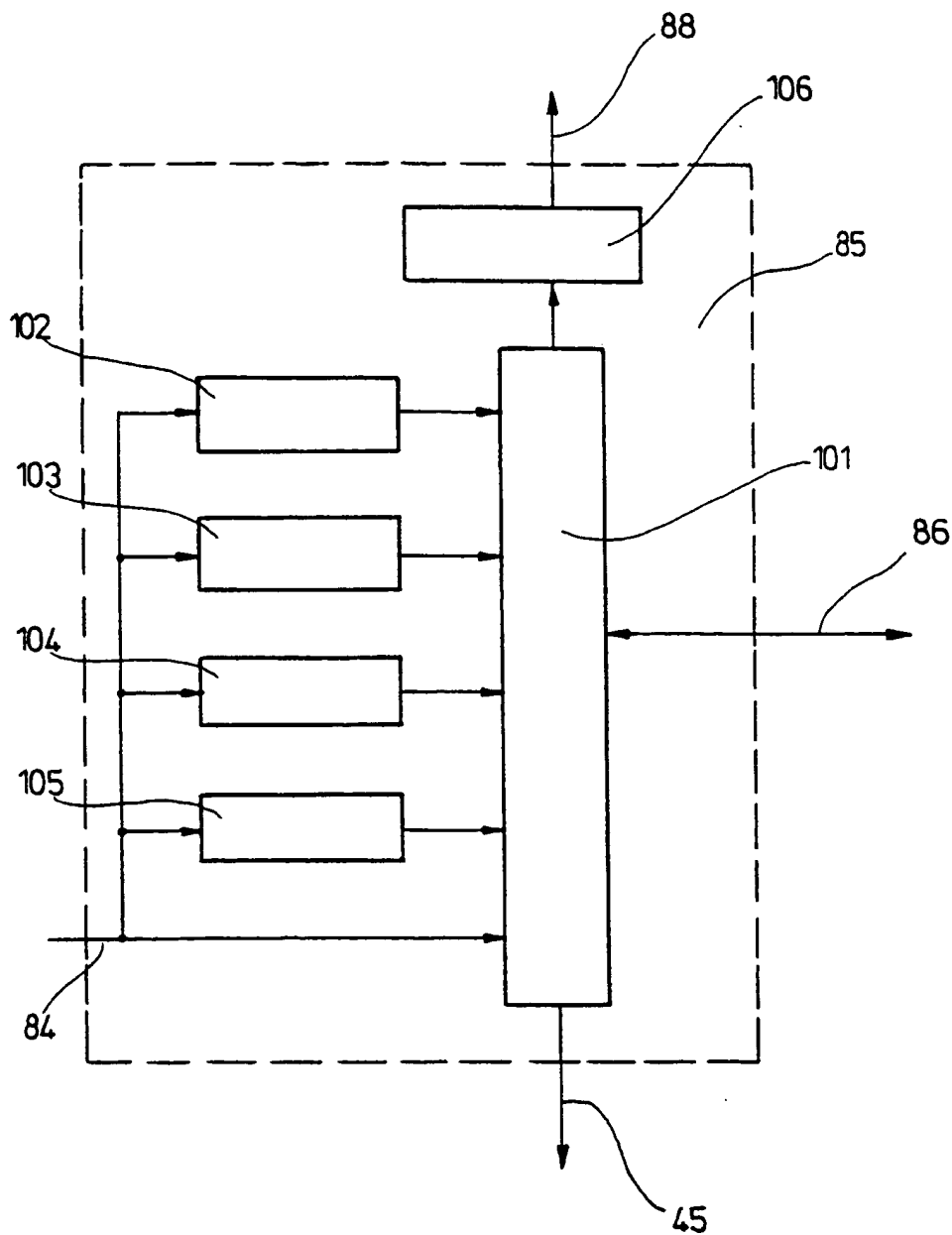


Fig. 10

DERWENT-ACC-NO: 2002-482736

DERWENT-WEEK: 200252

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Culture apparatus with scanner for use as incubator, comprises culture device equipped with shelf having scanner arranged in frame case

INVENTOR-NAME:

PRIORITY-DATA: 2000JP-0284073 (September 19, 2000)

PATENT-FAMILY:

| PUB-NO        | PUB-DATE       | LANGUAGE | PAGES | MAIN-IPC    |
|---------------|----------------|----------|-------|-------------|
| JP 2002085054 | March 26, 2002 | N/A      | 006   | C12M 003/00 |

A

INT-CL (IPC): C12M001/00; C12M001/14 ; C12M001/34 ; C12M003/00 ; C12M003/04

ABSTRACTED-PUB-NO: JP2002085054A

BASIC-ABSTRACT: NOVELTY - A culture apparatus (1) with scanner, comprises culture device (2) equipped with shelf (6) arranged in a frame case (4). The shelf has a scanner (7).

DETAILED DESCRIPTION - A computer (3) controls the operation of the scanner and collects image data obtained with the scanner.

USE - As incubator for observation of growth/division of bacteria or cell.

ADVANTAGE - Number of bacteria or colonies (16) of cell of animals and plants, can be observed continuously or periodically with respect to previously set up schedule, without removing Petri dish (5) from the frame case of the culture apparatus. The environmental condition for cultivation of bacteria or cells is fixed, and is not influenced by change in external temperature, humidity or oxygen concentration. As the scanner requires minimum light source, culture can be performed in dark place. A scanner can be automatically controlled with the computer, and a user can obtain accurate image data automatically, without spending labor for extraction of the Petri dish for observation. By performing an image processing by computer, identification of the kind of microbial species or cell can be performed automatically and compared with the standard image data prepared previously.

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows the culture apparatus with a

scanner. (Drawing includes non-English language text).

Culture apparatus 1

Culture device 2

Computer 3

Frame case 4

Petri dish 5

Shelf 6

Scanner 7

Colony 16



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フレームケースと該フレームケース内に配設された棚を備えた培養装置本体を有する観察装置付き培養装置であって、上記棚は、スキャナーを有することを特徴とする観察装置付き培養装置。

【請求項2】 上記棚は、上記スキャナーのスキャナーケースにはめ込まれたカバー用透明板がサンプルを入れたシャーレを載置する構造であることを特徴とする請求項1記載の観察装置付き培養装置。

【請求項3】 上記棚は、スキャナーのスキャナーケースのカバー用透明板上にさらにシャーレ載置用透明板を有する構造であることを特徴とする請求項1記載の観察装置付き培養装置。

【請求項4】 上記棚は、シャーレを載置する板又は金網を有し、該板又は金網上に上下方向に可動なスキャナーケースを有するスキャナーが上下逆さまに配設されており、上記サンプルの上に上記スキャナーが載置されることが可能な構造であることを特徴とする請求項1記載の観察装置付き培養装置。

【請求項5】 上記スキャナーを有する棚は、1又は2以上配設されていることを特徴とする請求項1、2、3又は4記載の観察装置付き培養装置。

【請求項6】 上記スキャナーの光源又は受光部には光学フィルターが付設されていることを特徴とする請求項1、2、3、4又は5記載の観察装置付き培養装置。

【請求項7】 上記スキャナーは、コンピュータに接続されており、

該コンピュータは、上記スキャナーの動作を制御するとともに、上記スキャナーで得られた画像データを処理する構成であることを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6記載の観察装置付き培養装置。

【請求項8】 上記コンピュータは、その記憶装置に予め記憶したスケジュールに従って、上記スキャナーを動作するとともに、上記画像データを処理することにより、培養されているサンプルの画像をモニター表示又は印刷に供し、又は上記培養されているサンプルをチェック若しくは同定を行う構成であることを特徴とする請求項1、2、3、4、5、6又は7記載の観察装置付き培養装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、培養装置（インキュベータ）に関し、特に、シャーレを培養装置のフレームケースから取り出すことなく、シャーレ内の培養された細菌や動植物の細胞のコロニーの数や状態等の培養状態を、任意の時に又は予め設定したスケジュールに従って、連続的又は定期的に観察することのできる観察装置付き培養装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来の培養装置は、扉付き筐体内の培養室内に、トレーが複数段設けられ、その上にサンプル（試料）である細菌や動植物の細胞等を入れたシャーレを載置でき、環境（温度、湿度、酸素濃度、炭酸ガス濃度等）が自動的に調節可能な構成である（特開平6-153907号公報等参照。）。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来の培養装置では、培養装置の培養室内の環境は自動的に調節可能であるが、シャーレ内の培養状況を観察する装置は特に設置されていない。観察するためには、一度、培養装置の扉を開いて培養室からシャーレを取り出す必要がある。

【0004】そのために、培養室内の環境に影響を与え、適切な培養に必要な一定の環境条件を維持できない等の危険があった。例えば、嫌気性の細菌や、暗所で培養が必要なサンプル等では、扉の開閉による環境の変化は好ましくない。又、取り出されるサンプル自体も、外部の環境条件に一時的にも置かれるために、その影響を受け、正確な培養状況を観察できなくなるという危険性もあった。

【0005】さらに、従来の培養装置では、一々サンプルを取り出して観察するために、そのスケジュール管理を常に気を使わなくてはならず、又観察のためのシャーレの取り出しもきわめて煩わしい作業であった。

【0006】本発明は、このような従来の培養装置の問題を解決することを目的とするものであり、培養室及びシャーレ内のサンプルへの環境変化が生じないようにし、又サンプルの観察に関連する、培養装置からサンプルの取り出し作業やその時間管理等の労力を極力少なくする培養装置を実現することを課題としている。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は上記課題を解決するために、フレームケースと該フレームケース内に配設された棚を備えた培養装置本体を有する観察装置付き培養装置であって、上記棚は、スキャナーを有することを特徴とする観察装置付き培養装置を提供する。

【0008】上記棚は、上記スキャナーのスキャナーケースにはめ込まれたカバー用透明板がサンプルを入れたシャーレを載置する構造としてもよい。

【0009】上記棚は、スキャナーのスキャナーケースのカバー用透明板上にさらにシャーレ載置用透明板を有する構造としてもよい。

【0010】上記棚は、シャーレを載置する板又は金網を有し、該板又は金網上に上下方向に可動なスキャナーケースを有するスキャナーが上下逆さまに配設されており、上記サンプルの上に上記スキャナーが載置されることが可能な構造としてもよい。

【0011】上記スキャナーを有する棚は、1又は2以上配設されている構成としてもよい。

【0012】上記スキャナーの光源又は受光部には光学フィルターが付設されている構成としてもよい。

【0013】上記スキャナーは、コンピュータに接続されており、該コンピュータは、上記スキャナーの動作を制御するとともに、上記スキャナーで得られた画像データを処理する構成としてもよい。

【0014】上記コンピュータは、その記憶装置に予め記憶したスケジュールに従って、上記スキャナーを動作するとともに、上記画像データを処理することにより、培養されているサンプルの画像をモニター表示又は印刷に供し、又は上記培養されているサンプルをチェック若しくは同定を行う構成としてもよい。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明に係る観察装置付き培養装置の実施の形態を、実施例に基づいて図面を参照して以下説明する。本発明に係る観察装置付き培養装置は、少なくとも培養装置本体を備えており、さらに、培養装置本体で得られたデータを処理するコンピュータを備えている。

【0016】本発明に係る観察装置付き培養装置本体の特徴は、シャーレを載置する棚がスキャナーを有することであり、シャーレ内の培養の状態を任意の時に、又は予め設定したスケジュールに従って連続的又は定期的に観察できるようにした構成である。

【0017】（実施例1）図1、2は、本発明に係る観察装置付き培養装置の実施例1を説明する図である。図1（a）において、実施例1の観察装置付き培養装置1は、培養装置本体2と、後述するように培養装置本体2のスキャナー等の動作を制御するとともに、培養装置本体2のスキャナー等で得られたデータを処理するコンピュータ3を備えている。

【0018】この培養装置本体2は、フレームケース4内に、培養用のシャーレ5を載置する棚6が複数段配設されて構成されている。この実施例1では、複数段の棚6が配設されている例で説明するが、棚6は1段でもよい。

【0019】図2は、棚6の具体的な構成を説明する図である。複数の棚6は、夫々スキャナー7を有する。具体的には、この実施例1では、棚6は、図2（a）に示すようなシャーレ載置用の透明ガラス板8（透明樹脂板でもよい。）がスキャナー7上に一体に取り付けられて構成される。

【0020】これは、通常のスキャナーは、そのスキャナーケース9の上部開口をカバー用透明ガラス板（通常のスキャナーでは原稿を載置する原稿台用ガラス板）をはめ込んで密閉しているが、このようなスキャナーのカバー（密閉）用透明ガラス板を、直にシャーレ載置用の透明ガラス板8として使用して成る棚の構造である。

【0021】あるいは、図2（b）に示すように、スキャナー7にはめ込まれたカバー用透明ガラス板10の上

に、シャーレ載置用の透明ガラス板8を密着して配設する構成としてもよい。

【0022】棚7は、観察装置付き培養装置専用機の棚として培養装置本体2の製造段階で組み込んでよいが、従来の培養装置（インキュベータ）のシャーレ載置用のトレイ上に、スキャナーを取り付けた構成としてもよい。このようにすれば、従来の培養装置にも簡単に適用可能である。

【0023】いずれにしろ、実施例1の培養装置本体2は、図1（b）に観察の際の要部断面を示すように、シャーレ5の下方にスキャナー7を設け、下方からシャーレ5の蓋11（後述するように通常シャーレは逆さに載置しシャーレ5の蓋11が下向きになる。）を通して走査して観察するから、いわば底面観察型の構造である。

【0024】スキャナー7は、受光部12が水平に移動し走査を行う構造のものが利用される。近年、益々薄型のスキャナーが開発され、実用化されているが、このような薄型のスキャナを利用すると、培養装置本体2が全体的にコンパクトとなるので好ましい。例えば、図2（c）に示すように、受光部の本体を構成する長尺の移動可能な走査杆13に薄型のCCD14を直線上に貼り付けることにより薄いスキャナーを構成することができる。

【0025】複数の棚6の夫々のスキャナー7は、図1（a）に示すように、コンピュータ3のI/Oポート（入出力部）に接続されている。コンピュータ3は、I/Oポート、CPU、記憶装置等を有し、表示装置（モニター）及びプリンタを付設している。

【0026】スキャナー7は、利用者が必要に応じて任意の時にスキャニング動作（走査）させることもできるし、あるいは予め設定したスケジュールに従って、コンピュータ3による自動的な制御で、連続的又は定期的に動作させることもできる。

【0027】この動作スケジュールは、培養される菌種、培養装置の培養目的や観察手法等に応じて適宜プログラム化されてコンピュータ3の記憶装置に記憶しておき、このプログラムに従って、CPUでスキャナ制御動作信号が生成され、スキャナー7に送信される。これによって、スキャナー7の動作が自動的に制御される。

【0028】以上の構成から成る実施例1の観察装置付き培養装置1の作用を説明する。使用に際しては、必要な数のシャーレ5に培地（寒天等）及び培養する細菌（例えば、嫌気性の細菌）や動植物の細胞等を入れ、透明ガラス板8の上に、図1（b）に示すように逆さに（蓋11が透明ガラス板8に当接するように）載置する。そして、コンピュータ3により、所定のプログラム化されたスケジュールに従って、スキャナー7を動作するようにセットしておく。

【0029】時間が経過すると、シャーレ5内では、細菌や細胞が培養され、同一種の細菌や動植物の細胞の塊



(集落)であるコロニー16が培養されていく。そして、セットされているプログラム化されたスケジュールに従って、スキャナー7が連続的又は時間間隔をおいて動作し、図1(b)に示すように、受光部12が右矢印方向に移動し、透明ガラス板8上に載置された複数のシャーレ5を下方から走査する。この走査により、蓋11を通してコロニー16の数、色、大きさ等の状態がスキャンされ、その画像データが得られる。

【0030】このようにして得られたシャーレ5内のコロニー16の状態を示す画像データは、コンピュータ3に送られる。この画像データは、コンピュータ3において、表示装置でモニター可能であり、又プリンタで印刷され、目視による観察に供せられる。

【0031】又、画像データは、コンピュータ3で、必要に応じて所要の画像処理が施され、予めコンピュータ3の記憶装置内に記憶されている画像処理データと比較して、コロニー16の数の確認、培養状態のチェック、その種類の同定等のいろいろな用途に供せられる。

【0032】以上のとおり、フレームケース4を開いてシャーレ5を棚6から取り出す必要がなく、シャーレ5内の細菌や細胞のコロニー16等の培養状態が観察できるから、フレームケース4内の環境条件を一定に維持することができ、特に、嫌気性の細菌の培養などにきわめて有用である。

【0033】(実施例2)図3は、本発明に係る観察装置付き培養装置の実施例2の特に棚に係る構成を説明する図である。図3(a)は斜め上方から見た斜視図であり、図3(b)は斜め下方から見た斜視図である。図3(c)は、観察の際の要部断面図を示す。

【0034】実施例2の観察装置付き培養装置は、実施例1同様に、培養装置本体と、培養装置本体で得られたデータを処理するコンピュータを備えている。この培養装置本体は、密閉されたフレームケース4内に、シャーレ5を載置する棚17が設けられている。

【0035】この実施例2では、図3に示すように、棚17は格子状の金網18を有するとともにスキャナー19を有する。もちろん、この棚17は金網18ではなく、透明又は不透明のガラス、樹脂、金属等の板材(図示せず。)で構成してもよい。又、この実施例2では棚17を複数段備えているが、もちろん棚17は1段でもよい。

【0036】さらに、実施例2の棚17の構造について詳細に説明すると、この棚17を構成する複数の金網18の夫々の上方には、カバー用透明ガラス板10を有するスキャナー7が上下逆さまで(倒置状態で)配設されている。

【0037】スキャナー7は、上下方向に移動可能な構成としている。そのための最も簡単な構造としては、図3(a)において想像線で示すように、その左右両側コーナー部等に、上下方向にスキャナをガイドするガイド

枠19を設けるとともに、スキャナー7の底壁20(図3(a)中では上面)に把持部21を設けた構造とする。

【0038】なお、さらに簡単な構造としては、このようなガイド枠19を設けることなく、従来の培養装置の金網上に、利用者が適宜スキャナーを持ち上げて上下方向に移動可能状態に薄型のスキャナーを載置して成る構造でもよい。

【0039】スキャナー7の電源及び信号入出力用のケーブルは、特に図示しないが、各段のスキャナー7に近接したフレームケース4の適所にコネクタを介して接続し、フレームケース4の外部へ伸ばされ、電源やコンピュータ3に適宜接続可能な構成とする。

【0040】この実施例2の培養装置の棚17は、図3(c)で示すように、シャーレ5の上にスキャナー7を載置し、上方から逆さまに金網18上に置いた構造であり、シャーレ5の底22及び培地23を通してコロニー16を走査し、観察可能とするから、いわば上面観察型の構造である。

【0041】実施例2の観察装置付き培養装置1の使用に際しては、利用者は、スキャナー7に付設された把持部21を持ってスキャナ7全体をガイド枠19に沿って持ち上げて金網18上にスペースをあける。そして、金網18上にシャーレ5を載置する。そして、スキャナー7を左右両側のガイド枠19に沿って下降させ、シャーレ5の上からかぶせるようにして載置する。

【0042】そして、実施例1同様に、利用者が任意に、あるいはコンピュータ3に設定されたプログラム化されたスケジュールに従って、スキャナー7を連続的又は時間間隔をおいて動作する。そして、図3(c)に示すように、受光部12は、金網18上に載置された複数のシャーレ5を、上方からカバー用の透明ガラス板10を通して図中右方向に走査し、コロニー16の数、色、大きさ等の画像データが得られる。

【0043】このように走査して得られたシャーレ5内のコロニー16の状態についての画像データは、コンピュータ3に送られ、実施例1同様に、表示、印刷、画像処理等されて、細菌や細胞の培養状態の観察や種類の同定等の用途に利用される。

【0044】この実施例2もフレームケースを開いてシャーレ5を棚17から取り出す必要がなく、シャーレ5内の細菌や細胞のコロニー16等の培養状態が観察できるから、フレームケース内の環境条件を一定に維持することができる、という点で、実施例1と同様である。

【0045】特に、この実施例2の観察装置付き培養装置では、従来使用されている培養装置の金網18上に、軽量・薄型のスキャナー7を逆さまに配置すれば直ぐ適用できる構成であるので、きわめて有用である。

【0046】以上、本発明に係る観察装置付き培養装置の形態を実施例に基づいて説明したが、本発明は特にこ

のような実施例に限定されことなく、特許請求の範囲記載の技術的事項の範囲内でいろいろな実施例があることはいうまでもない。このようないくつかの例を次に説明する。

【0047】細菌や細胞の種類、あるいは培養条件によっては、暗所で培養が必要な場合がある。この場合には、培養装置本体を明るい環境に置いておいて観察することはできない。このような用途に対しては、スキャナー7で走査する時のみ照明し、即ち必要最低限で照明する光源24を、図2(d)に示すように、走査杆13に

CCD14とともに設ける構成とするとよい。

【0048】又、微生物に光を照射すると特殊な遺伝子を持つコロニーのみが所定領域の波長の光を発生するような場合、この所定領域の波長の光のみを通過させるバンドパスフィルタを受光部に付設すれば、そのようなコロニーのみを検出することができる。

【0049】あるいは、微生物に所定の領域の波長の光を照射すると特殊な遺伝子を持つコロニーのみが光を発生するような場合、この所定の波長の光のみを通過させるバンドパスフィルタを光源に付設すれば、そのようなコロニーのみを検出することができる。

【0050】本発明に係る観察装置付き培養装置の動作を制御し、スキャナーで得られた画像データを処理するコンピュータは、スキャナーの専用機として設けてもよいが、培養装置の培養室内の環境(温度、湿度、酸素濃度等)を制御するコンピュータを利用(併用)してもよい。

【0051】実施例2の観察装置付き培養装置において、スキャナー7の上下動を、モータ等の駆動力を利用し、自動化した構成としてもよい。例えば、両フレームケースとスキャナー7の間に、ラックとピニオン、あるいはねじ直動機構等の駆動装置を設けて自動的に上下動させるような構成としてもよい。

【0052】

【発明の効果】以上の構成から成る本発明に係る観察装置付き培養装置によれば、次のような顕著な効果を奏する。

(1) フレームケースからシャーレを取り出すことなくその培養状態を、任意の時に又は予め設定したスケジュールに従って、連続的又は定期的に観察できるので、フレームケース内の環境条件が外部の温度、湿度、酸素濃度等の影響を受けることがなく、シャーレ内の細菌や細胞は、一定の環境条件下で培養され、その細菌や細胞の本質的な特徴に基づく培養状態(成長、分裂状態等)が観察することができる。特に、嫌気性の細菌の場合は、外部空気による影響が大きいので効果的である。又、観察の際のみに、スキャニングにして画像を得るために必

要最低の光源でもって照明すれば良いので、暗所で培養が必要な場合にもきわめて有用である。

【0053】(2) スキャナーは、コンピュータで、プログラム化された一定のスケジュールに基づいて自動的に連続的又は定期的にスキャニング動作を行えるようにし、しかもその走査で得られた画像データを自動的にコンピュータに取り込めるような構成としたので、利用者は、観察のタイミングを気にすることなく、又観察のためのシャーレの取り出し作業等の労力を費やすことなく、正確な画像データを自動的に入手することができる。

【0054】(3) コンピュータにより、画像データはモニター表示され、又プリンタで印刷される等、いろいろな態様で取り出しが可能である。さらに、画像データを画像処理をすれば、任意の時、又は予め設定したスケジュールにおける連続的又は定期的な培養状況が数値化され、チェック可能となる。さらにコンピュータで画像処理を施されることにより、予め別途用意した基準画像データと比較して、菌種や細胞の種類の同定も自動的に行うことが可能となる。

【0055】(4) 本発明は、その構成からして従来の培養装置(インキュベータ)に簡単に適用できる。特に、金網の棚を有する従来の培養装置の場合は、金網上に、軽量・薄型のスキャナーを逆さまに配置する上面観察型の構成を採用すれば、きわめて簡単に本発明を、従来の培養装置を観察装置付き培養装置として利用することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例1を説明する図である。

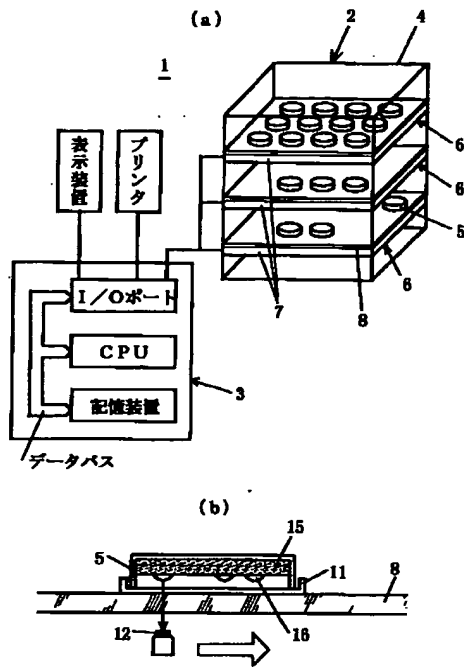
【図2】本発明の実施例1の特に棚の構造を説明する図である。

【図3】本発明の実施例2を説明する図である。

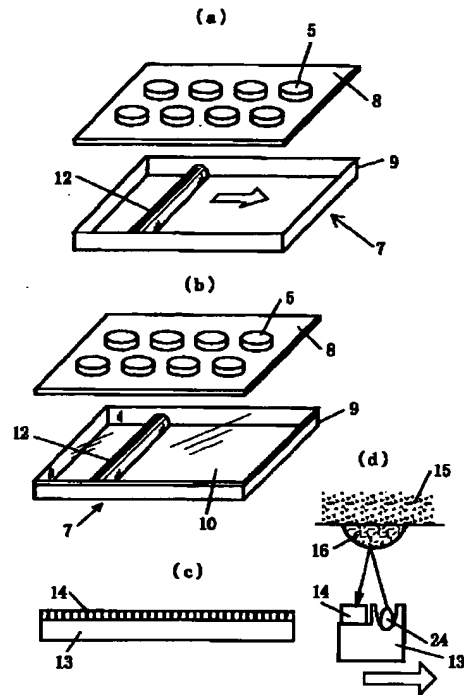
【符号の説明】

- 1 観察装置付き培養装置
- 2 培養装置本体
- 3 コンピュータ
- 4 フレームケース
- 5 シャーレ
- 6、17 棚
- 7 スキャナー
- 8 シャーレ載置用透明ガラス板
- 10 スキャナケースのカバー用透明ガラス板
- 12 受光部
- 15、23 培地
- 16 コロニー
- 21 把持部

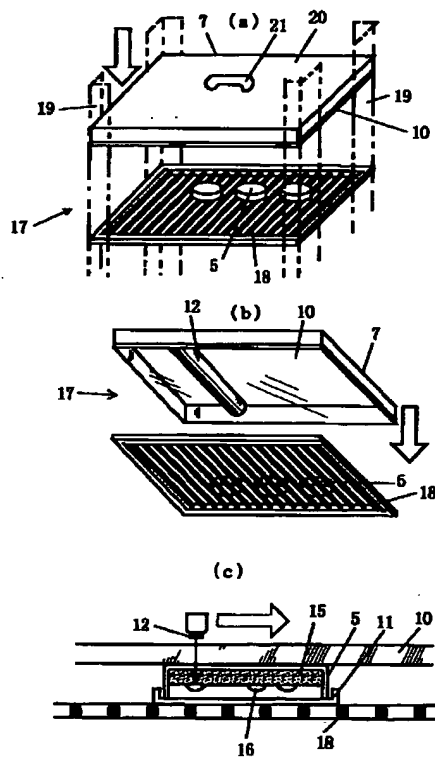
【図1】



【図2】



【図3】



CLIPPEDIMAGE= JP410185803A

PAT-NO: JP410185803A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 10185803 A

TITLE: TANGIBLE COMPONENT ANALYZER, AND ANALYZING METHOD THEREFOR

PUBN-DATE: July 14, 1998

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

YONEDA, KEIZO

KAWAMURA, YOSHIHISA

TEJIMA, SHINICHI

KATSUMA, YOSHIYUKI

KAWASHIMA, SUMIHIKO

INT-CL (IPC): G01N021/27;C12M001/34 ;G01N001/28 ;G01N001/30 ;G01N015/14 ;G01N033/49 ;G01N033/493 ;C12Q001/02

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To perform automatic analysis with high precision and accuracy using an image analysis technology by putting a sample liquid containing tangible components on a light- transmissible plate and then picking up the image thereof.

SOLUTION: A sample liquid, i.e., a urine specimen, is stirred and a required quantity thereof is dispensed into reaction tubes 19a, 19b and 19c. A required quantity of dyeing liquid is then injected into the reaction tube 19a and a reaction liquid of the sample liquid and the dyeing liquid is demarcated and injected into a slide glass 5 integrated with a cover glass. The light from a light source lamp 7 is then passed through a condenser lens 8 condensed in the sample liquid on the slide glass 5 and the sample image of a tangible component in the sample liquid is formed at a focus position through an objective lens 9. Subsequently, the sample image picked up by means of a CCD camera 10 under control of an image processing control circuit 12 and digitized through an A/D converter 13 before being processed through a feature extraction circuit 15 and

an identification circuit 16. A central control section 17 accumulates the classification results of image over the entire field of view and converts the accumulated results, along with the number of microorganisms received from an operating circuit 22, into a qualitative data based on a previously inputted boundary value and delivers the qualitative data to an output unit 23.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-185803

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月14日

| (51) IntCl. <sup>6</sup>             | 識別記号 | F I           |   |
|--------------------------------------|------|---------------|---|
| G 0 1 N 21/27                        |      | G 0 1 N 21/27 | A |
| C 1 2 M 1/34                         |      | C 1 2 M 1/34  | B |
| G 0 1 N 1/28                         |      | G 0 1 N 1/30  |   |
| 1/30                                 |      | 15/14         | D |
| 15/14                                |      |               | C |
| 審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 11 頁) 最終頁に続く |      |               |   |

|              |                 |          |   |
|--------------|-----------------|----------|---|
| (21) 出願番号    | 特願平9-303216     | (71) 出願人 | 000003160<br>東洋紡績株式会社<br>大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号 |
| (22) 出願日     | 平成9年(1997)11月5日 | (72) 発明者 | 米田 圭三<br>福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内  |
| (31) 優先権主張番号 | 特願平8-293040     | (72) 発明者 | 川村 良久<br>福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内  |
| (32) 優先日     | 平8(1996)11月5日   | (72) 発明者 | 手嶋 真一<br>大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 東洋紡績株式会社内          |
| (33) 優先権主張国  | 日本 (J P)        | (74) 代理人 | 弁理士 高島 一                                    |
|              |                 | 最終頁に続く   |   |

(54) 【発明の名称】 有形成分分析装置及び有形成分分析方法

(57) 【要約】

【解決手段】 被検液中の有形成分の標本像を拡大し、拡大された標本像を撮像し、撮像された画像を処理して、各種成分に識別する有形成分分析方法において、被検液をディスプレイのスライドガラス上に載せる。

【効果】 被検液中の有形成分の分析にかかわる作業が簡素化され、検査技師の負担を低減させるとともに、より精密性、正確性の高い分析結果を提供することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 透光板上の被検液を撮像するための撮像ステージと、被検液中の有形成分の標本像を拡大する手段と、有形成分の標本像を撮像する手段と、撮像された画像を処理して各種成分に識別する手段とを有する有形成成分分析装置。

【請求項2】 被検液が尿である請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項3】 上記撮像する手段が、有形成分の標本像の焦点を自動で合わせる機能を有している請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項4】 撮像された画像を処理して各種成分に識別した結果を記憶しておく手段を有している請求項3記載の有形成成分分析装置。

【請求項5】 上記識別する手段が、予め設定された視野分の全識別結果から分析結果を算出する機能と、分析結果を出力器から出力する機能とを有している請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項6】 被検液に成分識別力を助力するための試薬を添加する手段を有する請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項7】 上記識別する手段が学習認識機能を有する請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項8】 上記識別する手段が有形成分の特徴量の範囲指定を学習し、識別するものである請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項9】 上記識別する手段が有形成分に起因する光学的特徴量に基づいて、有形成分の量を算出する機能を有している請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項10】 上記拡大する手段が二種類以上の拡大倍率を有している請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項11】 上記透光板が、スライドガラスである請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項12】 上記透光板が、被検液を被覆する被覆透光板と一体的に形成されたものである請求項1記載の有形成成分分析装置。

【請求項13】 ①透光板上に被検液を載置する工程と、②被検液中の有形成分の標本像を拡大する工程と、③有形成分の標本像の焦点を自動で合せ、有形成分の標本像を撮像する工程と、④撮像された画像を処理して、各種成分に識別する工程とを少なくとも有することを特徴とする有形成成分分析方法。

【請求項14】 被検液が尿である請求項13記載の有形成成分分析方法。

【請求項15】 予め設定された視野数になるまで、上記②の工程から上記③の工程まで、または上記②の工程から④の工程までを、撮像位置を変えて繰り返すことを特徴とする請求項13記載の有形成成分分析方法。

【請求項16】 上記①の工程から④の工程までを全自動で行うことを特徴とする請求項13記載の有形成成分

析方法。

【請求項17】 被検液中に成分識別を助力するための試薬を添加する工程を有している請求項13記載の有形成成分分析方法。

【請求項18】 成分識別を助力するための試薬が、Sternheimer-Malbin染色法、Sternheimer 染色法、Prescott-Brodie 染色法、Behre-Muhlberg染色法、SudanIII染色法、Lugol 染色法、hemosiderin 染色法、Papanicolaou染色法、4-chloro-1-naphthol 法、Field 染色法、Quaglin-Flemans法、Kaplow法、佐藤・関谷法、ベルリン青法、ギムザ染色法、ライト染色法、パッペンハイム染色法、コンゴ赤染色法、メチル緑・ピロニン染色法、アルシアン青染色法、ショール染色法、フォイルゲン染色法、オイル赤O染色法、Breckner 法、ハインツ小体染色法、中性赤・ヤヌス緑超生体染色法、ブリリアントクレシル青染色法のうち少なくとも一法に用いられている成分の一種類または二種類以上を含有する試薬である請求項17記載の有形成成分分析方法。

【請求項19】 有形成分に起因する光学的特徴量に基づいて、有形成分の量を算出する工程を有する請求項13記載の有形成成分分析方法。

【請求項20】 光学的特徴量がATP測定用試薬による発光量である請求項19記載の有形成成分分析方法。

【請求項21】 上記透光板が、被検液を被覆する被覆透光板と一体的に形成されたものである請求項13記載の有形成成分分析方法。

【請求項22】 上記透光板が、スライドガラスである請求項13記載の有形成成分分析方法。

【請求項23】 透光板および被覆透光板のうち少なくとも一つの材料が、ガラス、プラスチック、化学的処理を施したガラスまたは化学的処理を施したプラスチックである請求項21記載の有形成成分分析方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、被検液中の有形成分を分析するための装置及び方法に関し、特に尿中や血液中に含まれる血球類などの有形成分を画像解析技術を用いて自動分析するための装置及び方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、被検液中の有形成分の分析、例えば尿沈渣成分の分析は、①尿サンプルを遠心分離する、②アスピレーター又はピペットを用いて、あるいはデカンテーションによって上澄み液を除去する、③残った残渣成分のうち一定量をスライドガラスに塗布し、カバーガラスを載せ標本とする、④顕微鏡にセットし、有形成分（血球類、上皮細胞類、円柱類、微生物類、結晶塩類など）を分類分析する、の各工程からなっている。現在、この作業のすべてを手によって実施しており、検査技師の大きな負担になっているほか、作業が用手であるので、ばらつきが大きく、また判断には当然個人差が

あり、正確性にも問題が指摘されていた。

【0003】これらの検査作業を自動化する装置として近年、検体の塗布標本を作製せず被検液に染色液を混和した後、懸濁させたままフローセルに流し、物理統計的な方法や光学的な方法などによって分析するフローサイトメーター法により自動分析する方法がある（特開平4-337460号公報、特開平5-296915号公報、特開平5-322885号公報）。

【0004】しかしながら、上記のフローサイトメーター法により自動分析する方法では、有形成分は常に流れているためそれぞれに焦点を合わせることが極めて困難であり、焦点は一定の位置に固定されている。また、フローセルはある程度の厚みがある。これらのことより、上記のフローサイトメーター法では焦点が合わされた位置に流れて来た有形成分しか正確に測定できず、更には、該位置から少し離れたところに有形成分が位置した場合は、焦点がずれた分だけぼやけてしまい合焦時とは異なった画像計測結果が得られ誤った判断結果が得られることがある。

【0005】また、この方法ではフローセルが固定され、連続使用されるので、前検体分のキャリーオーバーがあり、正確性や精密性に問題がある。また、分析精度を上げるため、染色液によって被検液を染色する場合、当然染色液によるフローセルの汚染があり、かつ染色液の成分が蓄積するので、経時的にノイズが増大し、測定精度が低下する危険性がある。さらに物理統計的な計測方法（レーザ光を用いた被検成分の散乱強度測定など）では、顕微鏡観察による画像観察データとかい離を生じ、かい離検体に対して再度顕微鏡画像観察をしなければならないといった課題があった。

【0006】さらに、フローセルの汚染を低減させるため、従来用いられていた分析に最適な染色液の濃度を低くした場合、染色度合いが弱くなり分析能が低下することがあった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】以上の実情に鑑み、本発明は、被検液、特に尿中の有形成分分析（尿沈渣分析など）にかかわる作業の全て又は一部を自動化し、キャリーオーバーや染色液による汚染の危険性があるフローセルを使用せず、精密性、正確性の高い装置及び方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意検討した結果、有形成分が含まれる被検液を流さずに透光板上に載置し、これを撮像することによって、フローサイトメーター法の欠点を解消し得ることを発見し、上記目的を達成できるに至った。

【0009】即ち、本発明の有形成分分析装置は、透光板上の被検液を撮像するための撮像ステージと、被検液中の有形成分の標本像を拡大する手段（以下、「拡大手

段」という。）と、標本像を撮像する手段（以下、「撮像手段」という。）と、撮像された画像を処理して各種成分に識別する手段（以下、「識別手段」という。）とを有することを特徴とする。また、上記装置は、被検液が尿の場合に特に有用である。

【0010】更に、上記装置においては、撮像手段が標本像の焦点を自動で合わせる機能を有していること、識別手段が、予め設定された視野分の全識別結果から分析結果を算出する機能と、分析結果を出力器から出力する機能とを有していること、当該装置が撮像された画像を処理して各種成分を識別した結果を記憶しておく手段を有すること、或いは当該装置が被検液に成分識別力を助力するための試薬を添加する手段を有することも特徴とする。

【0011】また、上記装置においては、識別手段が学習認識機能を有していること、識別手段が有形成分の特徴量の範囲指定を学習させ有形成分の量を算出する機能を有していること、識別手段が有形成分に起因する光学的特徴量に基づいて有形成分の量を算出する機能を有すること、拡大手段が一種以上の倍率を有していること、透光板がスライドガラスであること、或いは透光板が、被検液を被覆する被覆透光板と一体的に形成されたものであることも特徴とする。

【0012】本発明の有形成分分析方法は、①透光板上に被検液を載置する工程と、②被検液中の有形成分の標本像を拡大する工程と、③有形成分の標本像の焦点を自動で合せ、有形成分の標本像を撮像する工程と、④撮像された画像を処理して、各種成分に識別する工程とを少なくとも有することを特徴とする。また、上記分析方法は、被検液が尿の場合に特に有用である。

【0013】また、上記分析方法において、予め設定された視野数になるまで、上記②の工程から③の工程まで、または上記②の工程から④の工程までを、撮像位置を変えて繰り返すこと、或いは上記①の工程から④の工程までを全自動で行うことを特徴とする。

【0014】更に、上記方法において、被検液中に成分識別を助力するための試薬を添加する工程を有していること、成分識別を助力するための試薬が、Sternheimer-Malbin染色法、Sternheimer 染色法、Prescott-Brodie 染色法、Behre-Muhlberg染色法、SudanIII染色法、Lugol 染色法、hemosiderin 染色法、Papanicolaou染色法、4-chloro-1-naphthol 法、Field 染色法、Quaglinio-Flemans法、Kaplow法、佐藤・関谷法、ベルリン青法、ギムザ染色法、ライト染色法、バッペンハイム染色法、コンゴ赤染色法、メチル緑・ピロニン染色法、アルシアン青染色法、ショール染色法、フォイルゲン染色法、オイル赤O染色法、Breckner 法、ハインツ小体染色法、中性赤・ヤーマス緑超生体染色法、プリリアントクレシル青染色法のうち少なくとも一法に用いられている成分の一種類または二種類以上を含有する試薬であること、有形



成分に起因する光学的特徴量に基づいて、有形成分の量を算出する工程を有すること、光学的特徴量がATP測定用試薬による発光量であること、透光板が被検液を被覆する被覆透光板と一体的に形成されたものであること、透光板がスライドガラスであること、或いは透光板および被覆透光板のうち少なくとも一つの材料がガラス、プラスチック、化学的処理を施したガラスまたは化学的処理を施したプラスチックであることを特徴とする。

【0015】

【発明実施の形態】

【0016】本発明は、体液、例えば尿、血液、血清、血漿、髄液、精液、前立腺液、関節液、胸水、腹水、分泌液等の分析や水質検査などに適用することができる。特に、尿、例えば原尿、濃縮尿、遠心分離後の沈渣等の分析に有効に用いられる。

【0017】本発明において分析の対象となる有形成分は、被検液中に分散ないし懸濁しているものであれば特に限定されるものではない。例えば被検液が尿の場合では、赤血球（変形赤血球、各種由来赤血球）、白血球、上皮細胞類（扁平上皮細胞、移行上皮細胞、尿細管上皮細胞、円形上皮細胞、尿道円柱上皮細胞、前立腺上皮細胞、精囊腺上皮細胞、子宮内膜上皮細胞、卵円形脂肪体、細胞質内封入体細胞、多辺形細胞など）、円柱類（硝子円柱、上皮円柱、顆粒円柱、蠟様円柱、脂肪円柱、赤血球円柱、白血球円柱、細胞円柱、硝子白血球円柱、ヘモグロビン円柱、ヘモジリデン円柱、ミオグロビン円柱、アミロイド円柱、蛋白円柱、空胞変形円柱、血小板円柱、細菌円柱、ビリルビン円柱、塩類円柱など）、微生物類（真菌、細菌、脂肪球、原虫、トリコモナス、精子など）、結晶・塩類（尿酸塩、リン酸塩、シュウ酸カルシウム、ビリルビン、シスチン、コレステロール、2,8-ジヒドロキシアデニン結晶など）、その他（核内封入体細胞、脂肪顆粒細胞、大食細胞、異型細胞）等が分析対象となる有形成分として挙げられる。

【0018】本発明の装置及び方法においては、透光板上に被検液を載置することを特徴とする。透光板は透光性を有し、被検液を載置可能なものであれば良く、例えば、スライドガラス等が挙げられる。スライドガラスは一回使い切り（ディスポーザブル）であるため、前検体のキャリーオーバーや染色剤による汚染の可能性がゼロであり、信頼性の高い測定結果を提供することができる。透光板の材料は、プラスチック（合成樹脂）、ガラスなど透光性を有するものであれば、特に限定されるものではない。なお、プラスチックの場合は、必要に応じて親水性を向上させるための化学的処理を施すのが良い。

【0019】透光板上に載置された被検液は、被覆透光板で被覆されていても良い。被覆透光板としては、例えばカバーガラスが挙げられる。被覆透光板の材料としては、上記した透光板と同様のものが挙げられるが、特に

限定されるものではない。図1は、被覆透光板となるカバーガラスと、透光板となるスライドガラスとが一体的に形成された、カバーガラス一体型スライドガラス1の斜視図である。図1(a)ではスライドガラス部2上に載置されたカバーガラス部3の対向する二辺が接着剤4などで封止され、残りの対向する二辺が開放状態になっている。図1(b)はスライドガラス部2上に載置されたカバーガラス部3の三辺が接着剤4などで封止され、残りの一辺が開放状態になっている。被検液を開放された一辺から分注すると、毛細管現象によりスライドガラス部2とカバーガラス部3との間隙に被検液が注入される。即ち、透光板であるスライドガラス部2に被検液が載置される。このようにカバーガラス一体型スライドガラス1を用いれば、簡単に所定量を正確に注入させることができ、カバーガラスをセットする煩雑な標本作製工程を省力化することができる。

【0020】透光板上の被検液を撮像するための撮像ステージは、透光板を載置し得るものであれば良く、特に限定されないが、撮像位置を変更できるように移動可能なものであるのが好ましい。移動は手動で行っても良いが、例えばサーボモータ、ステッピングモータやリニアモータ等を使用して機械的に行うのが好ましい。

【0021】撮像手段としては、デジタルカメラ、CCDカラービデオカメラ等が挙げられる。また、撮像手段には、有形成分の標本像の焦点を自動で合わせる機能（オートフォーカス機能）を付加しておくのが好ましい。拡大手段は、撮像前の標本像を光学的に拡大するものであっても良いし、撮像された標本像の画像をデジタル処理等して拡大するものであっても良い。具体的には、前記カメラに取り付けられるズームレンズや対物レンズ等が挙げられる。

【0022】被検液中の有形成分としては、血球類や細菌などの数 $\mu\text{m}$ の大きさのものから、円柱などの数百 $\mu\text{m}$ の大きさのものまでがある。従って、拡大手段の有する拡大倍率は、一種類のみとするよりも、二種類以上とするのが好ましい。この場合、小型の有形成分から大型の有形成分までをより精度よく解析することができる。また、拡大倍率は連続的に変化するものであっても良い。拡大倍率は有形成分に合わせて適宜決定すれば良い。

【0023】識別手段は、撮像された画像中の有形成分をその形態等に基づいて分類し、識別するものである。識別手段には、予め設定された視野分の全識別結果から分析結果を算出する機能と、分析結果を出力器から出力する機能とを付加するのが好ましい。なお、ここでいう予め設定された視野分とは、撮像する視野（画像）数のことをいう。また、識別手段には撮像された画像を一旦記憶しておくためのメモリ等を備えておくのが好ましい。

【0024】識別手段としては、例えば、上記の識別を

行うようにプログラミングされたコンピュータ、論理回路で構成された識別装置等が挙げられる。このうち、識別手段としてコンピュータを用いれば、各工程の動作、画像処理、記憶、計算、出力等すべての制御がソフト上で行えるようになり好ましい。

【0025】識別手段は学習機能を有しているのが好ましい。学習認識機能を有することによって、正確性、精密性の高い測定結果が提供される。識別手段は、①赤、緑、青を明度と色度とに分離する色抽出の範囲指定、②穴埋め、線分の書き込み、画像の切り離しからなる二値画像処理の範囲指定、③画像の特徴量（面積、円形度係数、円相当径、周囲長、絶対最大長、フェレ径 $X/Y$ 比、最大弦長 $X/Y$ 比、短軸長さ/長軸長さ比など）の範囲指定を学習し、識別を行うことができる。

【0026】また、識別手段による上記画像処理は、ソフトウェアにより、有形成分の形態に基づいて有形成分を分類分析するため、明らかに形状の違う円柱や扁平上皮などの分類に関しては精度が高いが、小型な腎上皮細胞や赤血球、白血球、細菌などの形態が似かよった場合には、分析能はどうしても低下してしまう。

【0027】そこで、本発明の装置においては、被検液に成分識別を助力するための染色剤などの試薬を添加する手段を本発明の装置に更に付加することによって、本発明の方法においては、被検液に成分識別を助力するための染色剤などの試薬を添加する工程を加えることによって、上記の形態の似かよった成分を分類し、分析能を向上させることができる。

【0028】試薬は特に限定されないが、一般的に知られているものとしてSternheimer-Malbin染色法（SM染色法）、Sternheimer 染色法（S染色法、NS染色法またはSternheimer 染色法の変法）、Prescott-Brodie 染色法、Behre-Muhlberg染色法（BM染色法）、SudanIII染色法、Lugol 染色法、hemosiderin 染色法、Papanicolaou染色法、4-chloro-1-naphthol 法、Field 染色法、Quaglini-Flemans法、Kaplow法、佐藤・関谷法、ベルリン青法、ギムザ染色法、ライト染色法、パッペンハイム染色法、コンゴ赤染色法、メチル緑・ピロニン染色法、アルシアン青染色法、ショール染色法、フォイルゲン染色法、オイル赤O染色法、Breckner 法、ハインツ小体染色法、中性赤・ヤーヌス緑超生体染色法、ブリリアントクレシル青染色法（「臨床検査アトラス1 尿沈渣」、「臨床検査技術全書3 血液検査」、「臨床検査法提要」、「染色法のすべて MEDICAL TECHNOLOGY別冊」）等のうち少なくとも一法に用いられている成分の一種類または二種類以上を含有するものが挙げられる。例えば、ある一つの染色法で用いられる複種類の染色剤及び添加剤の中から幾つかの染色剤及び添加剤を選択し、これらを組み合わせて試薬としても良いし、それぞれ別の染色法で用いられている複種類の染色剤を組み合わせ試薬としても良い。

【0029】なお、上記染色剤には、染色剤の保存安定性や防腐性能を高めるために、一般的に知られている防腐（抗菌）剤（各種抗生物質、EDTA塩類、ホウ酸、クエン酸、 $\text{NaN}_3$ 、プロクリン、ベンツイソチアゾロン、ヒリチオン、N-メチルイソチアゾール等）を添加しても良い。また、染色液を至適pHに保つ為に各種緩衝液を添加したり、有形成分の形態を保持するために各種塩類（EDTA塩類、石炭酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{AlCl}_3$ 等）、各種糖類（グルコース、フラクトース、ガラクトース、マルトース、キシリトール、ソルビトール）、シクロデキストリン類、グルタルアルデヒドを添加しても良い。更に、測定の妨げとなる不溶性物質を除くために各種界面活性剤や酵素類を添加しても良い。

【0030】さらに、形態による分類分析では十分な結果が期待できない場合には、本発明の装置においては、識別手段に、有形成分に起因する光学的特徴量に基づいて有形成分の量を算出する機能を付加するのが、又本発明の方法においては、有形成分に起因する光学的特徴量に基づいて、有形成分の量を算出することが好ましい。

【0031】例えば、被検液中の細菌類などの微生物の量を測定する際、分析精度をより向上させることを目的として発光試薬を被検液中に添加することができる。しかし、細菌類はその状態（死菌、生菌）によって染色度合いが異なるため、分析能が低下してしまう。そこで、さらに分析能を向上させるため、微生物がATP（アデノシン三リン酸）を産出することを利用し、被検液中のATPを測定する工程を加えることによって細菌類の量を正確に測定することができる。ATPの測定は、ルシフェラーゼ、ルシフェリンなどを含むATP試薬を利用し、ATP量に応じた発光量（光学的特徴量）を検知することによって行うことができる（化1参照）。

【0032】

【化1】

ルシフェラーゼ

↓



【0033】また、本発明の装置には、撮像された画像を処理して各種成分に識別した結果を記憶しておく手段（画像記憶装置）が備えられているのが好ましい。記憶しておく手段としては、記憶容量の大きい光磁気ディスク、固定ディスク、デジタルビデオディスク、CD-R等の補助記憶装置が挙げられる。本発明の装置に用いられる出力器としては、CRTディスプレイ、液晶ディスプレイ、プリンタ等の出力装置や上記補助記憶装置が挙げられる。

【0034】なお、出力装置としてディスプレイを用いる場合には、メニュー選択によって、測定結果や画像データの他、時刻、現在の装置の状況（各検体の測定状

況、各検体又は選択した検体の測定終了予定時刻又は必要残時間、廃液タンクの廃液量、純水タンクの残量、各試薬の残量、洗剤の残量、スライドガラスの残数)等を表示する機能や、選択指定した情報のみを離れた場所から読み取れるように拡大表示する機能を付加しても良い。

【0035】本発明の装置においては、識別手段に、分類不可能な有形成分について「その他成分」なる項目に分類する機能、又はその画像を後に呼び出して、技師が直接目視により判断し、その判断結果をデータに付け加えたり修正したりできる機能を付加しても良い。

【0036】本発明の装置には、ディスプレイの表示メニューの選択や当該装置の操作をリモコン装置を用いて遠隔操作できる機能を付加しても良い。更に、本発明の装置には、何らかのアクシデントが発生した場合、廃液タンクが満杯になった場合、純水、各試薬、洗剤、スライドガラス等の残りが少なくなった場合等には、画面表示、音又は信号によって警告を発する機能を付加しても良い。

【0037】本発明の装置には、緊急の分析に対応するため、分析中の検体の次に緊急検体(緊急の分析を要する検体)を優先して割り込ませる機能、又は分析を一時停止して直ちに緊急検体を分析する機能を付加しても良い。なお、緊急の分析は迅速に行う必要があるため、例えば緊急分析用ボタンを設置し、該ボタンの操作のみで装置に緊急の分析を行わせるようにするのが好ましい。

【0038】本発明の方法は、上記した本発明の装置を用いれば容易に行うことができる。即ち、自動で透光板上に被検液を載置する工程が行われ、拡大手段により被検液中の有形成分の標本像を拡大する工程が行われ、撮像手段により有形成分の標本像の焦点を自動で合せ、有形成分の標本像を撮像する工程が行われ、識別手段により撮像された画像を処理して、各種成分に識別する工程が行われる。このように本発明の装置を用いれば、本発明の方法を全自動で行うことができる。

【0039】

【実施例】以下、本発明の装置及び方法の実施例を図に基づいて説明するが、本発明の装置及び方法はこの実施例に限定されるものではない。

【0040】実施例1

図2は、本発明の有形成分分析装置の一例を示す図であり、尿沈渣成分の分析装置を示す。図2の例では、透光板としてはスライドガラス5が用いられている。スライドガラス5は、図1(a)に示したようにカバーガラスと一体的に形成されて、カバーガラス一体型スライドガラスとなっている。スライドガラス5は撮像ステージとなるXYテーブル6上に載置されている。XYテーブル6には駆動源としてステップモータが組み込まれている。XYテーブル6は駆動回路11からの信号を受けて駆動され、スライドガラス5をX座標軸方向及びY座標

軸方向に自在に移動、停止させて撮像位置を変更する。

【0041】撮像手段としては自動焦点機能付きのCCDカメラ10が用いられている。CCDカメラ10には拡大手段として、対物レンズが取り付けられている。識別手段は、画像処理制御回路12、画像メモリ14、特徴抽出回路15、識別演算回路16、中央制御部17および演算回路22で構成されており、同図では点線で囲まれている。23は、出力装置として用いられているディスプレイである。18は各種成分に識別した結果を記憶するための画像記憶装置である。次に、本発明の装置で行われる処理を時系列に説明する。

【0042】最初に、被検液となる尿検体をサンプル容器からアロープによって、三本の反応管19a、19b、19cに必要量分注する。なお、より均一に分注するため、尿検体は分注前に攪拌している。サンプル容器として予めバーコードが貼り付けられた容器を用いるのであれば、バーコード読み取り装置にて、予めバーコードを読み取る。バーコードを使用することによってサンプルの有無、種類、検体番号を読み取れば、以後の処理データおよびサンプルの識別を容易に行える。次に、染色液を反応管19aに必要量注入し、有形成分の染色を行う。約2分後、反応管19aから被検液と染色液との反応液を分取し、カバーガラス一体型スライドガラス(スライドガラス5)に注入する。なお、染色反応時間や反応温度は任意に設定している。

【0043】次に、被検液を撮像するため、光源となるランプ7から光を照射する。ランプ7から照射された光(点線部)は光軸上を進み、コンデンサレンズ8を通過してスライドガラス5上の被検液上に集光される。被検液中の有形成分の標本像は対物レンズ9により結像位置に形成され、この結像位置の標本像は、CCDカメラ10の撮像面上に画像として投影され、光電変換される。

【0044】画像処理制御回路12は、駆動回路11を制御してXYテーブル6の移動又は停止を制御するとともに、XYテーブル6が停止した際に、CCDカメラ10に撮像を行わせる。CCDカメラ10で得られた画像は、A/D変換器13によりデジタル化される。画像処理制御回路12は、このデジタル化された画像データを画像メモリ14に格納する。

【0045】画像処理制御回路12は、画像メモリ14への格納の終了後、さらにXYテーブル6を移動させて撮像位置(視野)を変え、上記と同様に撮像、A/D変換、メモリへの格納を行う。画像処理制御回路12は、この一連の動作を予め設定された視野数になるまで繰り返し行う。なお、撮像位置を変更するためのXYテーブル6の移動は、一視野分の画像解析が終了してから行うように制御しても良い。

【0046】次に、画像処理制御回路12は、画像メモリ14に格納された画像データを、特徴抽出回路15へ入力する。特徴抽出回路15は、画像の特徴量(例え

ば、有形成分の面積、円形度係数、円相当径、周囲長、絶対最大長、フェレ径 $X/Y$ 比、最大弦長 $X/Y$ 比、短軸長さ/長軸長さ比など)を一次パラメータとして抽出する。画像処理制御回路12は、これら一次パラメータ及びこれらの組合せ演算で生じる二次パラメータを識別演算回路16に入力する。

【0047】識別演算回路16は、ニューラルネットワークを用いて有形成分の分類を行う。ニューラルネットワークは、予め専門家の判断にもとづいて大量のデータを用いて学習を実行し、各ニューロン間の結合係数を最適化するものである。従って、識別演算回路16は、入力された一次および二次パラメータを用いてニューラルネットワーク演算を行い、対象となる有形成分の自動分類を実施する。なお、ニューラルネットワーク演算の代わりに、識別演算回路16には統計的学習認識方法を用いた有形成分の自動分類を行わせても良い。

【0048】中央制御部17は、分類結果及び画像データを画像記憶装置18に記憶させる。本実施例では、画像記憶装置18として、記憶容量が大きい光磁気ディスクが用いられている。

【0049】一方、尿検体中の細菌などの微生物量を測定するために、反応管19b中にトリクロロ酢酸を添加し、その一部の検体試料を分取してATP測定試薬を添加し、発光させる。反応管19c中にはトリクロロ酢酸を添加せずに、その一部の検体試料をブランクとして分取し、上記と同様にATP測定試薬を添加して発光させる。発光はルミノメータ20により検知する。積算回路21は、所定時間内にルミノメータ20にて検知された発光をカウントし、積算する。次に、演算回路22は、積算回路21により積算された発光の数(フォトン数)の情報を、予めATPの標準品によって算出された計算式に基づいてATP量に変換して微生物の数を算出し、算出結果を中央制御部17に入力する。

【0050】中央制御部17は、撮像された画像の各視野ごとの分類結果を全視野分積算し、演算回路22から入力される微生物の数と共に、予め入力された境界値(有形成分の標準値)に基づいて定性データ(例えば、-、±、+、++、+++など)に変換し、得られた定性データや画像データをディスプレイやプリンタ等の出力装置23に出力する。

【0051】図4は、本発明の有形成分分析方法の一例を示す工程ブロック図であり、図1に示す装置を使用して分析が行われている。以下、図4を各工程ごとに説明する。

【0052】〔尿検体採取工程〕本工程においては、尿原液200検体を遠心分離せずに攪拌後、各検体0.75mlをそれぞれ三本の所定の反応管に分注する。

【0053】〔染色工程〕本工程においては、尿検体を採取した反応管のうちの一本に、S(Sternheimer)染色液を0.25ml添加し攪拌する。

【0054】〔標本作製工程〕本工程は、透光板上に被検液を載置する工程である。なお、本工程においては、被検液となる染色液を添加した液から0.015mlを分取し、カバーガラス一体型スライドガラスの間隙部分に分注し標本作製している。

【0055】〔標本移動工程〕本工程においては、作製した標本を撮像ステージにセットしている。撮像ステージはセットされた標本を撮像位置まで移動させる。

【0056】〔撮像工程〕本工程は、被検液中の有形成分の標本像を拡大する工程と、拡大された有形成分の標本像の焦点を自動で合せ、有形成分の標本像を撮像する工程とである。本工程においては、最初に、CCDカメラに取り付けられた対物レンズ(拡大手段)によって標本像を拡大している。次に、撮像ステージにセットされたCCDカメラによって、自動で焦点を合せ、拡大画像を撮像している。

【0057】〔画像処理・記憶工程〕本工程は撮像された画像を処理して各種成分に識別する工程である。本工程においては、最初に、撮像した画像を光磁気ディスクに記憶する。次に、過去のデータを学習認識する機能を有した演算回路等を用いて、この記憶された画像データから尿中有形成分を各種成分に分類し、各種成分ごとに計数する。分類結果及び係数結果は制御計算工程へ伝達される。なお、上記した撮像工程、画像処理・記憶工程は、撮像ステージを移動させて撮像位置を変更しながら視野数が100になるまで繰り返行われる。

【0058】〔微生物量分析工程〕本工程は、有形成分に起因する光学的特徴量に基づいて、有形成分の量を算出する工程である。本工程においては、最初に尿検体採取工程で尿検体を分注した反応管三本のうち一本に、0.4%トリクロロ酢酸を0.75ml添加する。残りの一本にはなにも添加せずブランクとする。各反応管から尿検体0.01mlを分取し、これにATP測定試薬〔30mMグリシルグリシンバッファ(pH7.8)、5mM硫酸マグネシウム、0.1mM硫酸ルシフェリン、10U/mlルシフェラーゼを含有する。〕を0.5ml添加して発光を生じさせる。この発光をルミノメータを用いて検知し、積算回路等を用いて発光をカウントし、積算する。

【0059】次に、予めATPの標準品によって算出した計算式によって、各検体中のATP量を求める。その後、トリクロロ酢酸を添加した検体中のATP量と、ブランクとした検体中のATP量との差を求め、検体中の微生物起源のATP量を算出する。その結果を制御計算工程へ伝達する。図6に尿中ATP濃度と菌数との相関図を示す。

【0060】〔制御計算工程〕本工程においては、画像処理・記憶工程および微生物量分析工程の各工程から得られた結果を統合し、ディスプレイやプリンタ等に出力する。表1は、その出力(印字)例を示している。

【0061】

【表1】

| 検体番号 | 1 | 2 | ... | 200 |
|------|---|---|-----|-----|
| 白血球  | ± | ± | ... | +   |
| 赤血球  | + | + | ... | +   |
| 上皮細胞 | - | ± | ... | +   |
| 円柱   | ± | + | ... | ±   |
| 細菌類  | + | - | ... | ±   |

\*【0062】この実施例における画像処理による検査結果の一致率を表2にまとめた。即ち、撮像された各画像を目視して、画像処理により分類分析された成分名（白血球、赤血球など）と一致しているか否かを判断した。

【0063】

【表2】

\*10

| 有 形 成 分     | 白血球   | 赤血球   | 上皮細胞 | 円柱  | 細菌類 |
|-------------|-------|-------|------|-----|-----|
| 画像観察に対する一致率 | 88.9% | 90.3% | 78%  | 90% | 80% |

【0064】実施例2

図3は、本発明の有形成分分析装置の他の例を示す図である。図3の例では、図2の例と異なり、ATP測定試薬の添加はなく、よって図1の例で用いられているルミノメータ、積算回路、演算回路は備えられていない。従って、図3の例に示すように、尿検体は反応管19にのみ必要量が分取されている。それ以外の構成については図2に示した装置と同様である。

【0065】図5は、本発明の有形成分分析方法の他の例を示す工程ブロック図であり、図3に示す装置を使用して分析が行われている。以下、図5を各工程ごとに説明する。

【0066】〔尿検体採取工程〕本工程においては、尿原液検体を遠心分離せずに攪拌した後、この検体0.75mlを反応管に分取する。

【0067】〔染色工程〕本工程においては、尿検体を分注した反応管に、S (Sternheimer) 染色液を0.25ml添加し攪拌する。

【0068】〔標本作製工程〕本工程においては図4の例と同様に、染色液を添加した液から0.015mlを分取し、カバーガラス一体型スライドガラスの間隙部分に分注し標本作製する。

※

※【0069】〔標本移動工程〕本工程においては図4の例と同様に、作製した標本を撮像ステージにセットし、撮像位置まで移動させる。

【0070】〔撮像工程〕本工程においては図4の例と同様に、拡大された有形成分の標本像の焦点を自動で合せ、撮像ステージにセットされたCCDカメラによって拡大画像を撮像している。

【0071】〔画像処理・記憶工程〕本工程においては図4の例と同様に、撮像した画像を記憶し、画像データから尿中有形成分を各種成分に分類し、各種成分ごとに計数している。分類結果及び係数結果は制御計算工程へ伝達される。なお、撮像工程、画像処理・記憶工程は、撮像ステージを移動させて撮像位置を変更しながら視野数が100になるまで繰り返し行われる。

【0072】〔制御計算工程〕本工程においては画像処理・記憶工程から得られた結果を統合し、ディスプレイやプリンタ等へ出力する。表3は、その出力（印字）例を示しており、強拡大視野（HPF）における結果が記号で示されている。

【0073】

【表3】

|      | 15       |          | 16             |
|------|----------|----------|----------------|
| 検体番号 | 1        | 2        | ..... 200      |
| 白血球  | 1～4個/HPF | 1個未満/HPF | ..... 5～9個/HPF |
| 赤血球  | 5～9個/HPF | 5～9個/HPF | ..... 1個未満/HPF |
| 上皮細胞 | 1個未満/HPF | 1～4個/HPF | ..... 5～9個/HPF |
| 円柱   | —        | +        | ..... +        |
| 細菌類  | +        | —        | ..... ±        |

## 【0074】

【発明の効果】このように本発明の有形成分分析装置及び有形成分分析方法によれば、被検液中の有形成分の分析にかかわる作業が簡素化され、検査技師の負担を低減させることができる。また、測定対象が流体でないため標本像の焦点を容易に合わせることができ、更にフローセルを使用せずに透光板を用いるので、一回使い切り（ディスポーザブル）のものを使用することができ、前検体のキャリーオーバーや染色液による汚染の可能性がゼロである。即ち、本発明により、精密性、正確性の高い分析結果を提供することができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】カバーガラス一体型スライドガラス1の斜視図である。

【図2】本発明の有形成分分析装置の一例を示す図である。

【図3】本発明の有形成分分析装置の他の例を示す図である。

【図4】本発明の有形成分分析方法の一例を示す工程ブロック図である。

【図5】本発明の有形成分分析方法の他の例を示す工程ブロック図である。

【図6】尿中ATP濃度と菌数との相関図である。

## 【符号の説明】

\* 1 カバーガラス一体型スライドガラス

2 スライドガラス部

3 カバーガラス部

20 4 接着剤

5 スライドガラス

6 XYテーブル

7 ランプ

8 コンデンサレンズ

9 対物レンズ

10 CCDカメラ

11 駆動回路

12 画像処理制御回路

13 A/D変換器

30 14 画像メモリ

15 特徴抽出回路

16 識別演算回路

17 中央制御部

18 画像記憶装置

19 反応管

20 ルミノメータ

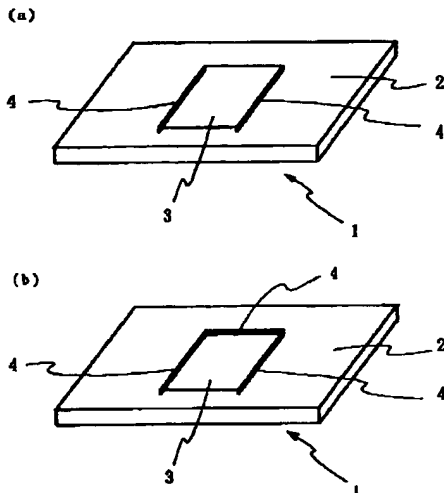
21 積算回路

22 演算回路

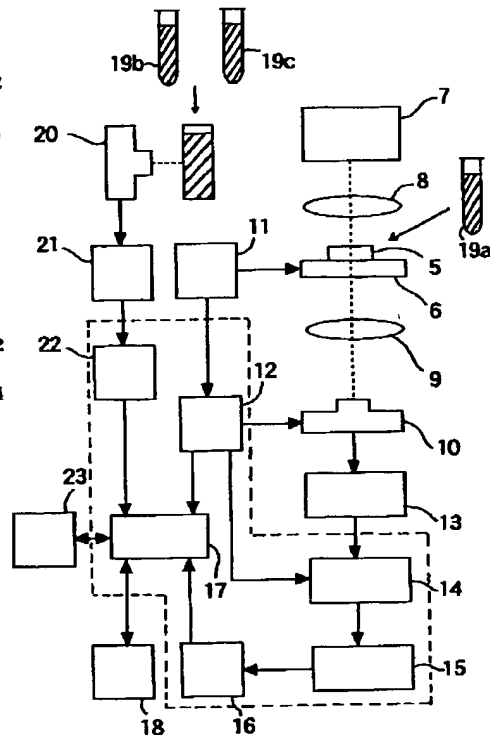
23 出力装置

\* 40

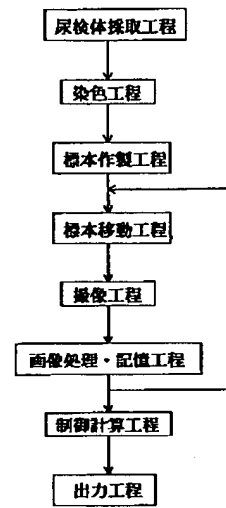
【図1】



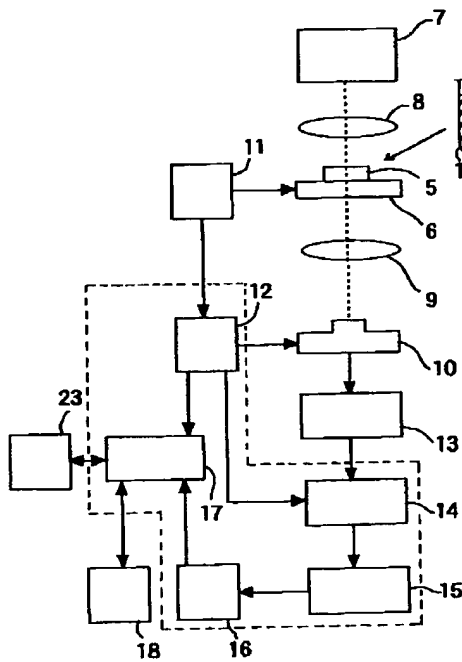
【図2】



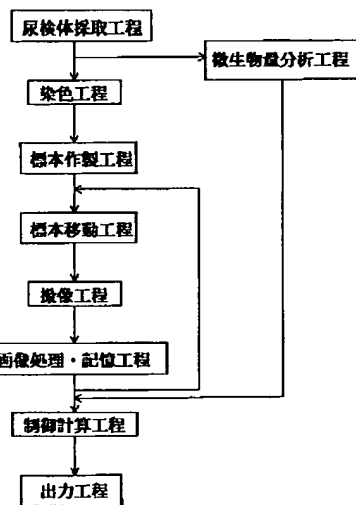
【図5】



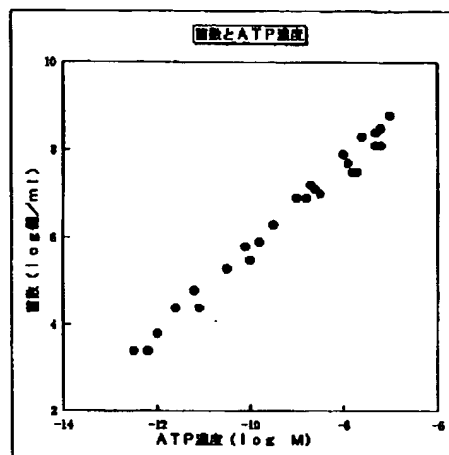
【図3】



【図4】



【図6】



$$Y = 0.95X + 15.2$$

$$r = 0.9923$$

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 15/14

G 0 1 N 33/49

H

33/49

33/493

B

33/493

C 1 2 Q 1/02

// C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 1/28

U

J

(72)発明者 勝間 祥行

(72)発明者 川島 純彦

大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 東洋紡

大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 東洋紡

績株式会社内

績株式会社内



CLIPPEDIMAGE= JP411221070A

PAT-NO: JP411221070A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 11221070 A

TITLE: INSPECTION OF MICROORGANISM AND APPARATUS THEREFOR

PUBN-DATE: August 17, 1999

INVENTOR-INFORMATION:

| NAME              | COUNTRY |
|-------------------|---------|
| HARA, AKIKUNI     | N/A     |
| ASANO, TOSHIMITSU | N/A     |
| HERAI, YOSHIAKI   | N/A     |
| OUMI, YOUKOU      | N/A     |

INT-CL (IPC): C12M001/34;C12Q001/04 ;G06F019/00 ;G06T007/00

ABSTRACT:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for inspecting microorganism, for example, capable of identification of species of bacteria and prediction of their growths in a shortened time and the apparatus therefor, and can previously know the state of specified microorganisms in the specimen after the passage of certain times necessary for proliferation.

**SOLUTION:** The specimen of a microorganism is image-processed and the processed results are compared with the data that are previously stored data to extract the features intrinsic to the microorganism thereby identifying its species, and then calculate the proliferation prediction after the passage of a certain time to previously detect the state of the proliferation of the microorganism in the specimen.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-221070

(43) 公開日 平成11年(1999) 8月17日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 M 1/34

C 1 2 M 1/34

B

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 Q 1/04

G 0 6 F 19/00

G 0 6 F 15/42

Z

G 0 6 T 7/00

15/62

3 9 5

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平10-36827

(22) 出願日 平成10年(1998) 2月3日

(71) 出願人 598162562

株式会社白寿生科学研究所

東京都板橋区大山東町32番17号

(72) 発明者 原 昭邦

東京都渋谷区元代々木町50番17号

(72) 発明者 浅野 敏光

千葉県柏市西山2丁目10番14号

(72) 発明者 戸来 義明

北海道札幌市白石区栄通12丁目1番13号

(72) 発明者 近江 暁浩

北海道札幌市手稲区西宮の沢1条3丁目

231番43号

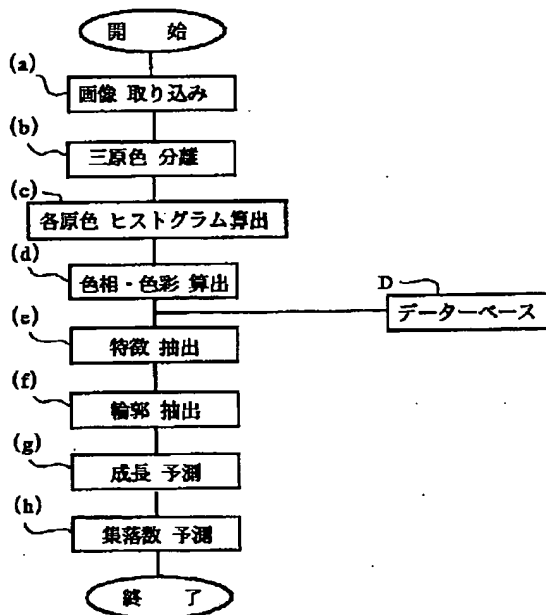
(74) 代理人 弁理士 松永 善蔵

(54) 【発明の名称】 微生物などの検査方法およびその装置

(57) 【要約】

【課題】 微生物などの検査方法およびその装置に関する。

【解決手段】 微生物の検査体を画像演算処理し、それらを予め蓄積したデータと比較することによって、微生物固有の特徴を抽出してその種別を確定し、つぎにその一定時間経過後の繁殖予測状態を算出することにより、検査体の微生物の繁殖に必要な一定時間経過後の状態を、事前に検知することを特徴とする微生物などの検査方法およびその装置。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物などの検査体を画像演算処理し、それらを予め蓄積したデータと比較することによって、微生物固有の特徴を抽出してその種別を確定し、つぎにその一定時間経過後の繁殖予測状態を算出することにより、検査体の微生物の繁殖に必要な一定時間経過後の状態を、事前に検知することを特徴とする微生物などの検査方法。

【請求項2】 微生物を持つ物質または物体から採取した試料より得た検査体、または必要に応じて培養の事前、事後に発光、染色などの処理を施した前記検査体の画像を三原色などに分離し、各原色のヒストグラム、色相、色彩を算出し、それらを微生物などの予め蓄積した前記手法によるデータと比較することによって、微生物固有の特徴を抽出してその種別を確定し、つぎにその一定時間経過後の繁殖予測状態を算出することにより、検査体の微生物の繁殖に必要な一定時間経過後の状態を、事前に検知することを特徴とする微生物などの検査方法。

【請求項3】 任意に設定した培養時間、温度などに基づいて、自動的に培養した検査体を、請求項2記載の画像演算処理した後、検査済みの検査体を排出または蓄積することを特徴とする微生物などの検査装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、微生物などの検査方法とその装置に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 通常、食品（食肉類、魚類などの水産品、その他あらゆる食品類）の加工にあたっては、食品となる原材料を工場において、一定の態様に加工して出荷する。そして工場内においては、加工食品の有害な細菌の有無を検査することが行われている。従来における加工食品などにおける細菌の有無の検査方法としては、試料の採菌を行い、シャーレ（検査体）とし孵卵器で所定の時間培養して、培養結果を専門家が目視によって計測、検知する方法があるが、これを正確に行うにはきわめて熟練を要する作業である。ここでコンピューターを用いた手法が近來提案されているが、それは、コンピューターに取り込んだ検査体の画像を二値化し、判定レベルを算出し、検査を行っている。

【0003】しかし、この画像を取り込む際において、それが即時に二値化される関係上、その際、検査体を照射して画像化するための光源の、検査体に対する照射角度、方向などの状態が異なると、それらが直ちに検査体の把握に影響して、検査の結果を左右し延いては誤差が生じることとなり、さらにまた前述の判定レベルが適正に確定できないこともあって、中々正確な検査ができない現状にある。そして食品となる原材料には、中毒菌となるような細菌が付着、混在、発生していたとしても、

その中毒菌は一定の時間を経ないと、その実態を明らかにしないものが多く、このため工場で原材料を食品として加工し、出荷後においてその菌が繁殖し、消費者の手に互った段階で、その繁殖した菌が原因で中毒を起こすことがしばしばである。

【0004】また従来の微生物の検査法は、検査の結果が出るまでに時間がかかっていたが、近年になって加工工程中や、半製品、製品などにおける微生物検査法として直顯法、膜染色法、インピーダンス法、蛍光染色法、蛍光プローブ法、バイオルミネッセンス法などの方法が行われるようになり、一応、迅速な対応ができるようになってきた。しかし、それらは迅速性、検出範囲、経済性などに各々の長所短所があることもあって、充分なものとは云えない現状にある。またそれらの中の一部において、特定の菌では菌種同定が可能ではあるが、実際には殆どの方法で菌種同定は不可能であった。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 この発明は微生物などの検査体における検査方法および装置として、短時間（5～6時間程度）で培養した検査体の画像を、三原色などに分離し、各色に対しヒストグラム、色彩、色相を算出し、細菌集落の成長を予測する成長係数や、各微生物固有の特徴を判断する特徴係数を定める、つぎに予め同手法と同様に算出して蓄積準備したデータを検索して、それらを比較することによって、菌種を特定（同定）し、さらにそれらの成長係数などを利用して、その菌に必要な一般的な培養時間（24、48時間など）経過後の繁殖予測を行うことにより、短時間に拘らず、事前に一定時間経過後の状態を容易に知ることができることを目的とするものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 たとえば細菌（生菌）などの一定時間後の繁殖状態を事前に知ることができるように、飲料水を含む食品などの食材、加工材から採取した検査体の画像を、コンピューター内において三原色に分離し、各原色のヒストグラム、色相、色彩を算出し、それらを各細菌類の予め蓄積した前記手法によるデータと比較することによって、細菌固有の特徴を抽出してその種別を確定し、つぎにその一定時間経過後の繁殖予測状態を算出することにより、特定された細菌の繁殖に必要な一定時間経過後の状態を、事前に検知することを特徴とする細菌などの検査方法およびその装置とする。

## 【0007】

【発明の実施の形態】 発明の実施の形態を実施例に基づき説明する。図1は、この発明の装置と検査方法のフローチャートであり、(1)～(12)は培養装置〔孵卵器〕(A)の構成と動作を示す。以下順次それらの構成と動作を述べると、孵卵器(A)として、(1)のシャーレとして、採菌した培地（寒天質）を所定の箇所に設置する

(採菌した培地を検査体と云う、またこの検査体が液状体の場合は、その菌を採取するのにフィルターを使用する、なお検査体としては他の種々の形態もあり得る)。

(2) において培養温度の設定を行う。これは孵卵器(A)の操作パネルを操作して必要とする温度設定を行う。

(3) において培養時間を設定する。これも孵卵器(A)の操作パネルを操作して必要とする時間設定を行う。(4) において孵卵器(A)の操作パネルを操作して、自動モード〔これは後述する端末装置(B)、処理装置(C)と連動する〕で動作する状態とする。

【0008】(5) において端末装置に対し、自動モード(ここで必要に応じ手動モードを、24時間、48時間の培養を行いたい場合などに使用する)であることを通知する。(6)の培養時間において、(3)で設定された自動モード培養時間の確認を行う。(7)の設定温度においては、(2)で設定している培養温度であるかの確認を行う。(8)の温度調整においては、設定温度の範囲内でない場合、過熱することを防止するための制御を行う。

(9)の培養完了通知では、培養完了通知を端末装置(B)、処理装置(C)に通知を行う。(10)の材料供給確認では、端末装置(B)より前記検査体の供給要求がなされているかの確認を行う、(11)の材料無し・終了通知では、検査体が無いことを端末装置(B)に通知し、自動モードの終了を行う、(12)の材料供給・読み取りでは、検査体を端末装置(B)に供給すると共に、バーコードを付与して読み込む。

【0009】(I)～(X)は端末装置(B)の構成と動作を示す。以下順次それらの構成と作動を述べると、(I)での自動モード設定では、端末装置(B)の操作パネルを操作し自動モード〔孵卵器(A)および後述の処理装置(C)と連動する〕で動作する状態とする。(II)の自動モード通知では孵卵器(A)、処理装置(C)に対し、自動モードであることを通知する。(III)の培養完了通知では、孵卵器(A)より培養完了通知がされるまで待機し、それがなされたことを通知する。(IV)の材料供給要求では、孵卵器(A)に対し検査体の供給を要求する。(V)の材料確認バーコード確認では、検査体が所定の位置に設定され、かつバーコードが読み込めていることを確認する。(VI)の上蓋除去では検査体の上蓋を取り外す。(VII)の材料定位置確認では、端末装置内の所定の位置に検査体が設定されていることの確認を行う。(VIII)のデータ送信では、所定の位置に設定された検査体画像を後述の処理装置(C)で正常に受信できたかの確認を行う。(IX)の材料排出動作では検査体を端末装置(B)外に排出または蓄積する。(X)の終了確認では、孵卵器(A)より検査体無し通知がされているか確認し、通知されている場合に処理装置(C)に終了通知を送信する。

【0010】(i)～(k)は前記した処理装置(C)の構成と動作を示す。以下順次それらの構成と作動を述べると、(i)は自動モード設定であり、処理装置(C)の操作

キーを操作し、自動モード〔孵卵器(A)および後述の処理装置(C)と連動する〕で動作する状態とする。(ii)は各装置の自動確認であって、孵卵器(A)、端末装置(B)が各自動モードに設定されているかの確認を行う。(iii)はデータ受信であって、端末装置(B)より送信される検査体画像を受信し、内部に蓄積する。正常に蓄積された場合、端末装置(B)に対し、正常受信信号を出力する。(iv)はデータ蓄積、(v)はデータ受信完了通知である。

【0011】ここで前述の端末装置(B)のデータ送信(VIII)から、処理装置(C)のデータ受信(iii)に送信された検査体画像のデータは、コンピューター内で画像処理される。すなわちその画像は3バイトで表現され、各バイトを論理演算を行うことにより分離する。そして分離したデータ毎にヒストグラム、色相、色彩算出を行うことにより、微生物の特徴を抽出する。この特徴を係数化し、予め準備しているデータベース(前記と同手法により、実験などで蓄積されたデータを分析し整理したデータ)を検索し、その検査体の菌種を特定する。さらに検索したこのデータを基に菌の成長予測を行う。これによって短時間の培養で、菌種、集落数が計測されることとなる。

【0012】前項0011の一連の処理操作についてさらに詳細に説明する。図2のフローチャートは、開始後、(a)では画像を取込み〔後述参照〕、(b)はその画像をたとえばレッド；R、グリーン；G、ブルー；Bの三原色に分離する、(c)では前記各原色のヒストグラム算出を行い、256種類の濃度分布に分解する、(d)では色相、色彩算出を行う、すなわち色の種類、濃度を確定する、つぎに(e)の菌種の特徴抽出にあたり、データベース(D)との比較が行われ、菌種の確定が行われる。すなわちいま処理した画像からの新データと、データベース(D)〔データベースの構成としては、ID、菌種(群/個別、たとえば大腸菌群)、特徴係数(R、G、B分布度〈ヒストグラム値〉、H、S分布度〈色相、色彩値〉)などが前述と同様の手法によって作成され、予めインプットされている〕のデータとを比較して、菌種の特徴が抽出され、菌種の確定が行われる。

【0013】ついで(f)では読み取りデータから集落の輪郭抽出を行う、(g)はその集落の成長予測、(h)は菌の集落数予測の各段階であり、ここで前記読み取りデータを基にして集落の輪郭を抽出し、各輪郭間の距離(または各輪郭の周囲長や、集落の面積など)で成長度 $\alpha$ 〔後述および数3参照〕を算出した結果から、たとえば24時間、48時間後の予測を行う。さらに以下において詳細を図示〔図3、図4(a)～(d)および図5(a)～(c)〕を参照して述べると、まず図3に示すところの、図2(a)の画像取込みの段階の例としては、画像読み取り装置としてカメラ機構(K)により、一定時間培養された検査体(Q)の検査体画像(Q')を、コンピューター(PC)内に取り込む。

【0014】すなわち前記図2(b)の三原色分離の段階では、コンピューター(PC)内のメモリである検査体画像(Q')は、R、G、Bの3バイトで表現される。それは多値面像(カラー画像:各画素が階調だけでなく、色をもつ画像)で表示され、これを三原色(色表現の基礎値)毎に、数1[一般式; Nは輝度の個数、FRは検出点の輝度、nは輝度、R<sub>i</sub>は検査点の輝度、 $\cap$ は論理積]のヒストグラム算出式を使用して分離する(各原色毎に階調算出、すなわち濃度を算出する)。この分離方法としてはたとえばR、G、Bを重ね、カラー表示を行う、こ

\* おいて、各原色のヒストグラムの算出を、図4(c)で示すグラフのように、前記R、G、B毎に濃度分布の算出を行う。つぎの図4(d)での色相、色彩算出では、数2の色相、色彩算出式を用いて、色彩S、色相Hを算出する。この式において、S<sub>r</sub>はR色の色相要素、S<sub>g</sub>はG色の色相要素、S<sub>b</sub>はB色の色相要素であり、また $\beta$ は画像取り込みシステムの、画像を鮮明にするための固有の係数である。

【数1】

$$\sum_{n=0}^{255} F(N) = FR(n) \cap R_i$$

【数2】

$$S = S_r + S_g + S_b$$

$$S_r = 255 - R + \beta$$

$$= \frac{255}{R+G+(G+B-2R)} + \beta$$

$$S_g = 255 - G + \beta$$

$$= \frac{255}{R+G+(B+R-2G)} + \beta$$

$$S_b = 255 - B + \beta$$

$$= \frac{255}{R+G+(R+G-2B)} + \beta$$

$$H = \frac{255 \times \theta}{2\pi}$$

$$\theta = \frac{2R-G-B}{\sqrt{B(R-85)^2 + (G+85)^2 + (B+85)^2}}$$

【0015】つぎに図2(e)の菌の特徴抽出の段階では、予め前記の手法で得たデータと比較して、検査体(Q)の検査体画像(Q')と、特徴的に共通する菌種を抽出する。つぎに図2(f)の集落の輪郭抽出では、読み取ったデータを基にした輪郭を抽出する。それは図5(a)に示すように、各輪郭《イ》、《ロ》間の距離(x<sub>1</sub>), (y<sub>1</sub>)を算出し、成長度 $\alpha$ を利用し、図5(b)の輪郭《イ'》、《ロ'》となる予測(数時間後)を行う。これらの図では菌の当初の輪郭《イ》、《ロ》が数3( $\alpha$  xはx軸方向の成長度成分、 $\alpha$  yはy軸方向の成長度成分、Eはx軸方向の成長度、Fはy軸方向の成長度)で算出した結果を画像展開して、輪郭《イ'》、《ロ'》となったもので、膨張して一個となった状態を示している。このように画像展開したデータをベースに集落数(コロニー数)などを計測する。それは図5(c)で示すように、x、y軸方向に走査して番号付け(ラベリング)を行う。つぎにy、x軸方向に(走査方向を変えて)走査して番号を確定する(図示では輪郭《イ》、《ロ》が輪郭《イ'》、《ロ'》となって合体し、①、②、③の三個の集落が表れたことになる)。この番号数※50

※が集落数となり、データベースの成長度 $\alpha$ などから一般的な培養時間後(24~48時間)の集落数を予測する。すなわちこの集落数の予測は、データベースの成長度 $\alpha$ を基に集落が成長する過程を予測し、新規データの集落周域の色濃度(後述参照)と、前記成長度で集落数を予測する。これにより菌種、集落数が判明する。以上のような方法によって集落数が計測されるのと同時に、菌種の同定も行われる。

【数3】

$$E = x_1(\alpha_x)$$

$$F = y_1(\alpha_y)$$

【0016】図6(a)は検査体(Q<sub>0</sub>)の(培地)表面を示し、そこには菌が存在しても未だはっきりとは表れていない状態である。図6(b)は培養途中の経過であり、菌の集落[コロニー](c1)が見られる。図6(c)はたとえば4~6時間経過時の状態であって、ここまでは培養時間となる。ここでは集落(c1)の成長の集落(c1<sub>1</sub>)とともに、その周域(w)に色変化が見られる。そこで前述のようにこの検査体画像(Q')を読み取り、データ

ベース(D)と比較して菌種を同定し、成長度や特徴係数などを設定する。つぎに成長の予測として、集落(cl<sub>1</sub>)の周域(w)の色彩、色相、色濃度、成長度、特徴係数などを利用して成長予測を行う。図6(d)は成長の段階で集落(cl<sub>1</sub>)のさらに成長した集落(cl<sub>2</sub>)と、新しい集落(cl<sub>3</sub>)が発生した途中経過の状態であり、図6(e)ではさらに進んで集落(cl<sub>2</sub>)、集落(cl<sub>3</sub>)の成長と、新しい集落(cl<sub>4</sub>)が発生した途中経過の状態である。そして図6(f)はたとえば24時間経過後の状態であって、前記各集落が成長し、さらにまた新しい集落が多数発生したことを示している。

#### 【0017】

【発明の効果】食品の加工において、採取した検査体を検査するに際して、その検査体の中において、毒性のある菌が存在するものが発見された場合、その菌がどのような速度で繁殖して行くかが問題であって、多数に繁殖した菌は当然に食中毒の原因となり得る。しかし微生物の検査には一定時間を要し、また各種の菌によってその時間はまちまちであり、同種の菌であっても外界の条件によって様にはいかないのが通例である。この発明は検査体においてその菌種を特定することと、その成長度などを予測することを、事前に短時間において可能としたものであって、特定された細菌の一定時間経過後の状態を、事前に、短時間で知ることができる。

【0018】この発明によれば何ら熟練度を要せずとも、何人でも容易に効率的に微生物などの事前の繁殖状況の検査を行うことができる。すなわちこの発明は、微生物などを短時間(従来法は24時間、48時間程度を要している)の培養で、その実態の検査が可能となるものであり、微生物のデータを蓄積し、それと比較することにより、微生物を特定し、その発生状況を予測して、的確に把握することができるとともに、比較する前記データを増大、蓄積することによって、その検査精度を高めることができるものである。このようにしてこの発明は食品の安全管理の徹底に役立ち、それはまた近年必要とされてきたPL法(製造物責任法)、HACCP(Hazard Analysis Critical Control Point; 危害分析・重要管理点方式)、あるいはGMP(Good Manufacturing Practice; 衛生規範)対策に当たってもまことに有用である。さらにこの発明は飲料水などを含む食品分野

に止まらず、医療、衛生、農業、土壌菌への適用、海水、下水その他水の利用、木材、空気利用などの微生物を持つあらゆる分野にもその応用範囲を拡大することができるものである。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の微生物などの装置と検査方法を示すフローチャート図。

【図2】この発明における微生物の画像取り込み、特徴抽出、成長予測などに関するフローチャート図。

【図3】この発明の装置の要部を示す説明図。

【図4】この発明の検査体の画像変換の経過を説明する図。

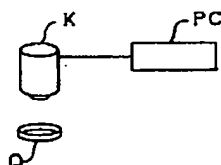
【図5】この発明の検査体の集落の輪郭抽出、計測状況を説明する図。

【図6】この発明の検査体の培養と成長予測を説明する図。

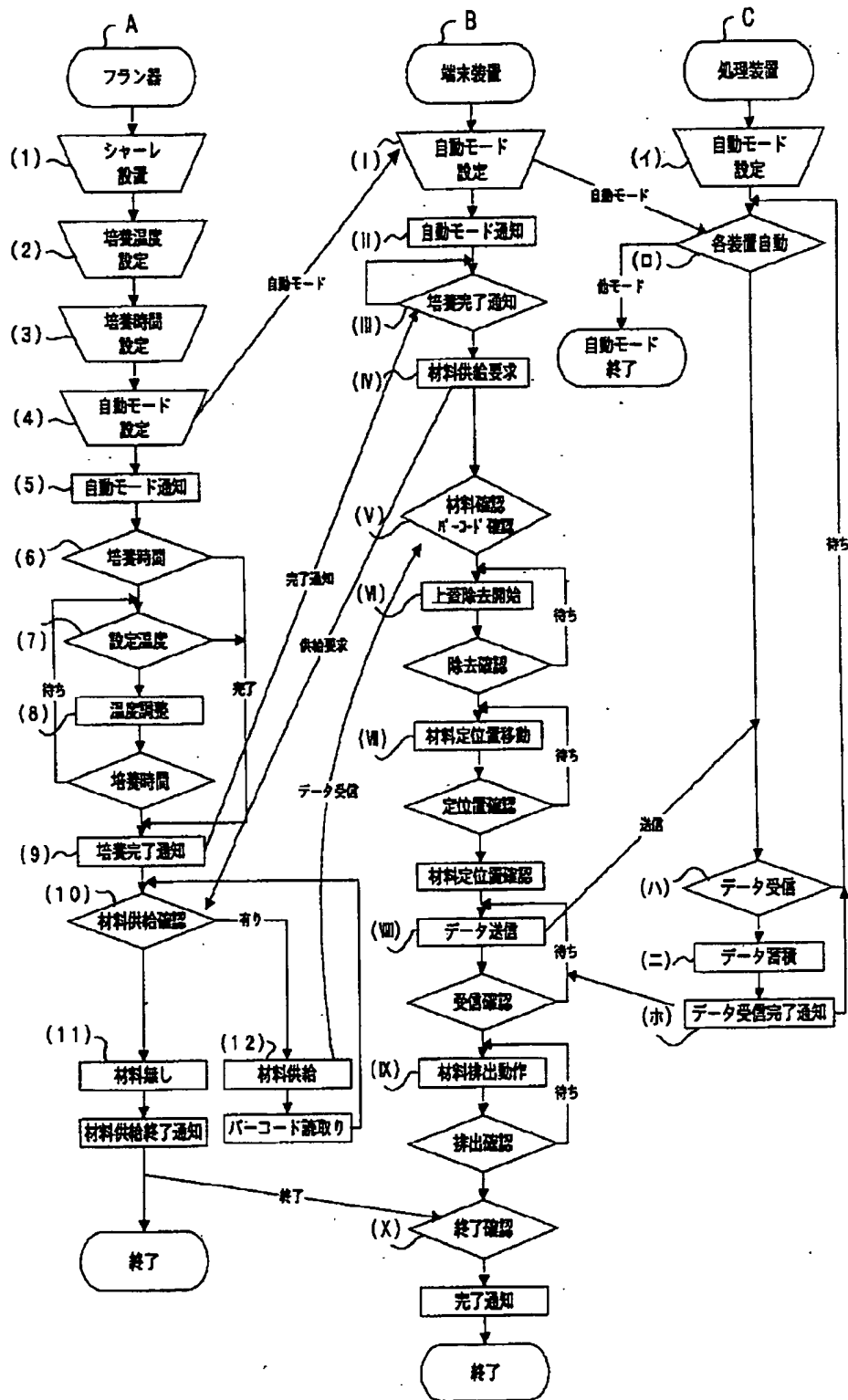
#### 【符号の説明】

- (A) 培養装置(孵卵器)
- (B) 端末装置
- (C) 処理装置
- (D) データベース
- (Q) 検査体
- (Q') 検査体画像
- (K) カメラ機構
- (PC) コンピューター
- (4) 凸部
- (5) ハーフ蒸着板
- (6) 拡散板
- (7) 面発光体
- (8) カバー
- (9) 接着剤
- (10) 両面テープ
- (11) 溶着用端面
- (12) 溶着ばり
- (L) 発光ランプ
- (c) 中央が突き出た部分
- (d) 溝穴
- (e) 取り付け用突起
- (w) リード線
- (h) 孔

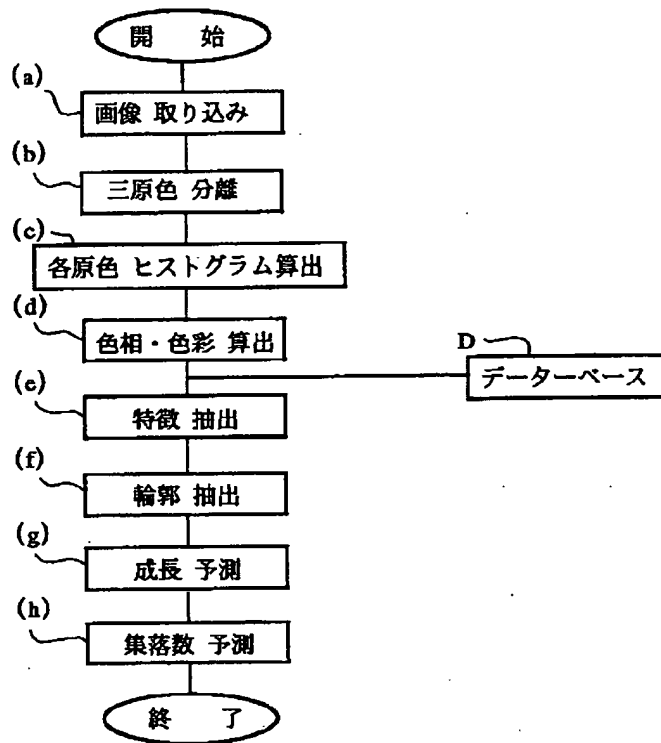
【図3】



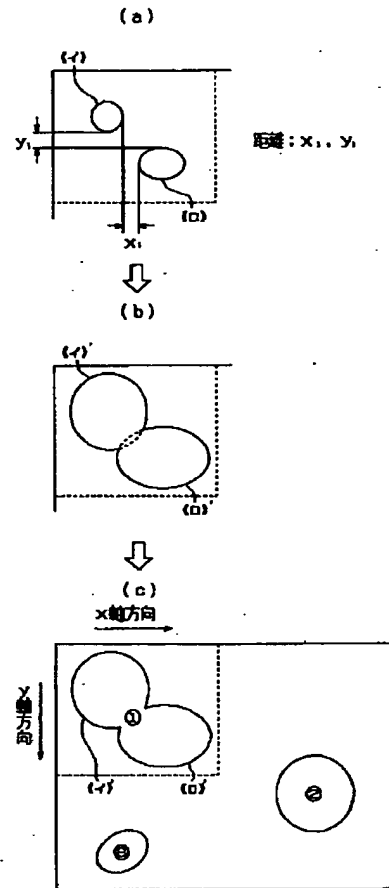
【図1】



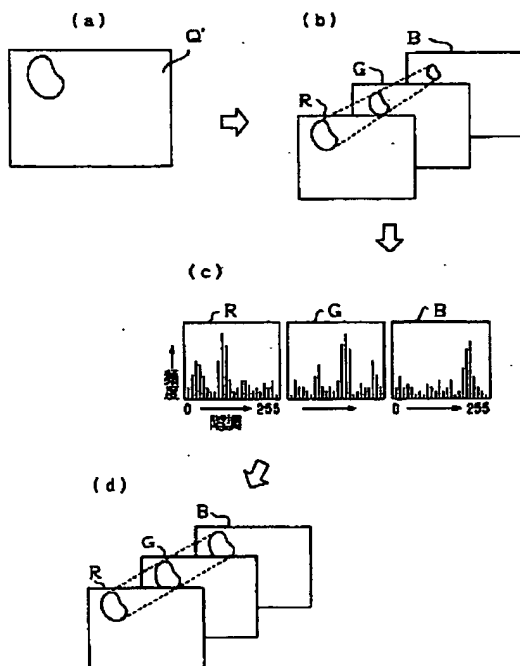
【図2】



【図5】

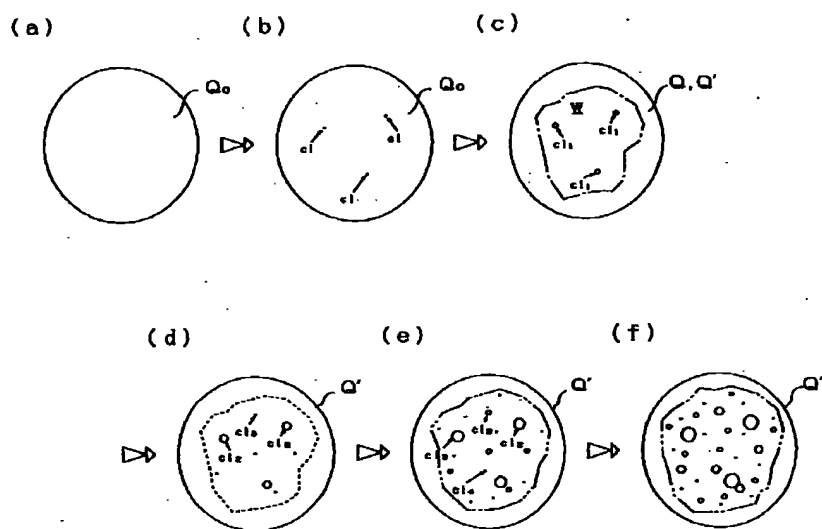


【図4】





【図6】



STIC-ILL

4/10 11/22

Fr m: Zeman, Mary  
Sent: Friday, November 22, 2002 9:56 AM  
To: STIC-ILL  
Subject: References 09/707703

421628

Please send a copy of the following articles

Thank you

Mary K. Zeman  
Examiner, 1631  
305-7133  
CM1 12A17  
mailbox: CM1 12D01

10896143

10

Weber, J.E. et al., "Fuzzy Reasoning, Possibility Theory and Probability Theory in Expert Systems for Histopathology", IEEE/Ninth Annual Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society, pp. 1560-1562, .COPYRGT.1987.

SO SPIE proceedings series, (1999), 3544, 110-120, 12 refs.  
Conference: Pathogen detection and remediation for safe eating.  
Conference, Boston MA (United States), 5 Nov 1998  
ISSN: 1017-2653

SO Ultramicroscopy, (July, 2000) Vol. 84, No. 1-2, pp. 85-99. print.  
ISSN: 0304-3991.

SO IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B: Cybernetics, (1998), 28(4), 583-591, 27 refs.  
ISSN: 1083-4419 CODEN: ITSCFI

SO Biotechnology and bioengineering, (1995), 48(1), 1-11, 36 refs.  
ISSN: 0006-3592 CODEN: BIBIAU

8877804

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

628-95-C-0002.  
the Air Force  
the use of the  
s supported by  
F grant ASC



ELSEVIER

Ultramicroscopy 84 (2000) 85–99

ultramicroscopy

www.elsevier.nl/locate/ultramicroscopy

## Mapping and fuzzy classification of macromolecular images using self-organizing neural networks

Alberto Pascual<sup>a</sup>, Montserrat Bárcena<sup>a</sup>, J.J Merelo<sup>b</sup>, José-María Carazo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup>GeNeura Team, Dpto Arquitectura y Tecnología de Computadores, Facultad de Ciencias, Campus Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

Received 23 September 1999; received in revised form 13 January 2000

### Abstract

In this work the effectiveness of the fuzzy kohonen clustering network (FKCN) in the unsupervised classification of electron microscopic images of biological macromolecules is studied. The algorithm combines Kohonen's self-organizing feature maps (SOFM) and Fuzzy *c*-means (FCM) in order to obtain a powerful clustering technique with the best properties inherited from both. Exploratory data analysis using SOFM is also presented as a step previous to final clustering. Two different data sets obtained from the G40P helicase from *B. Subtilis* bacteriophage SPP1 have been used for testing the proposed method, one composed of 2458 rotational power spectra of individual images and the other composed by 338 images from the same macromolecule. Results of FKCN are compared with self-organizing feature maps (SOFM) and manual classification. Experimental results prove that this new technique is suitable for working with large, high-dimensional and noisy data sets and, thus, it is proposed to be used as a classification tool in electron microscopy. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Image processing; Cluster analysis; Neural networks; Self-organizing maps; Fuzzy logic

### 1. Introduction

Image classification is a very important step in the three-dimensional study of biological macromolecules using electron microscopy (EM) because three-dimensional reconstruction methods require that the set of images that is going to be considered correspond to different views of the same biological specimen. Obtaining homogeneous set of images corresponding to views from the same direction of

the same biological specimen is a hard task due to several factors, mainly the low signal/noise ratio of the images obtained in the electron microscope and the potential structural heterogeneity of the biological specimen under study.

Image classification plays a central role as a pre-processing step in the three-dimensional analysis, as it is intended to separate the original population of images into different homogeneous sub-populations or classes. This classification is generally difficult in the sense that in most cases no prior information about the data structure is available, in this way unsupervised techniques must be used.

In the context of pattern recognition and classification in electron microscopy different approaches

\* Corresponding author. Tel: +34-91-585-4543; fax: +34-91-585-4506.

E-mail addresses: pascual@cnb.uam.es (A. Pascual), carazo@cnb.uam.es (J.-M. Carazo).



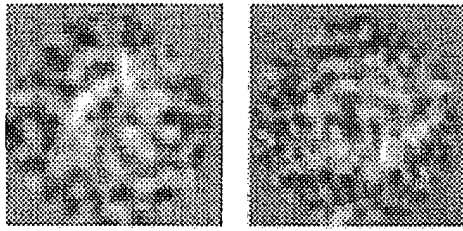


Fig. 1. Two examples of the images used for experiments. As it is evident, they have a low signal/noise ratio, making visual classification impossible.

data sets:

- Composed of 2458 rotational power spectra. Only the first 15 harmonics were considered, forming in this way a data set composed by 2458 15-dimensional feature vectors. Each spectrum was classified manually and was assigned a label corresponding to the most prominent harmonic (e.g. 6, 3, 2, etc.).
- Composed of 338 images that were extracted from a visually homogeneous 6-fold symmetric population. Original images have a very low signal/noise ratio (Fig. 1). The dimension of each image is  $50 \times 50$  pixels. As explained in Ref. [19] a ring mask with minimal radius of 12 pixels and maximal radius of 20 pixels was applied to each image. In this way 338 818-dimensional feature vectors were obtained (each feature vector is formed by the pixels inside the mask). In this case a previous classification was done using a non-supervised self-organizing map [19], dividing the set of images in two groups according to their handedness.

## 2.2. Kohonen's self-organizing feature maps

The Kohonen model is a neural network that simulates the hypothesized self-organization process carried out in the human brain when some input data are presented [10]. The structure of this neural network is composed of two layers: an input layer formed by a set of units (one for each feature of the input) and an output layer formed by units or neurons arranged in a two-dimensional grid. The algorithm maps a set of input vectors onto a set of

output vectors (neurons), but unlike other mapping algorithms, the output response is ordered according to some characteristic feature of the input vectors. It can be interpreted as a nonlinear projection of the  $p$ -dimensional input data onto an output array of nodes. Each neuron has a vector of coefficients associated with it ( $v_i \in \mathbb{R}^p$ ). In the future we will refer to this vector as "weight".

The functionality of the algorithm can be described as follows: when an input vector ( $x_i \in \mathbb{R}^p$ ) is presented to the net, the neurons in the output layer compete with each other and the winner (whose weight has the minimum distance from the input vector) as well as a predefined set of neighbors update their weights. This process is continued until some stopping criterion is met, usually, when weight vectors "stabilize" or when a number of iterations are completed.

The update rule for the output vectors used in this algorithm can be mathematically described as follows:

$$v_{i,t} = v_{i,t-1} + \alpha_t h_{r,t}(x_k - v_{i,t-1}) \quad (1)$$

here, the learning rule  $\alpha_t$  is a decreasing function of  $t$  (time, or iteration number) that controls the magnitude of the changes with time, and  $h_{r,t}$  is a function that controls the size of the neighborhood (according to radius  $r$ ) of the winning node to be updated during training. Both  $\alpha_t$  and  $h_{r,t}$  decrease monotonically during training in order to achieve convergence. The explicit forms of  $\alpha_t$  and  $h_{r,t}$  used in this paper are as follow:

$$\alpha_t = \alpha_0 \left( \frac{\text{iter} - t}{\text{iter}} \right), \quad (2)$$

where  $\text{iter}$  is the maximum number of iterations and  $\alpha_0$  is the initial learning rate value.

$$h_{r,t} = \exp(-\|r_j - r_c\|^2 / 2\sigma_t^2) \quad (3)$$

and

$$\sigma_t = 1 + (R_0 - 1) \left( \frac{\text{iter} - t}{\text{iter}} \right). \quad (4)$$

$R_0$  is the initial neighborhood radius and  $\|r_j - r_c\|$  is the distance in the map (output space) between

partially to all membership. In ion fuzzy clustering tool [5]. portant drawing undesired local ng minimized describing the convergence ith noisy and the "curse of ata needed to nce grows ex-] plays an im-

he application ological spec- nch both the map (SOFM) ing algorithm /e will refer to clustering net- s to overcome ove by taking self-organizing zzy clustering logy was first en successfully g [17,18]. The ' data analysis al step of the ge, a graphical ysis is used for clusters to be

of negatively e SPP1 G40P roscope [19]. d rotationally spectra were cribed in Ref. e created two

node  $j$  (the node been updated) and node  $c$  (the winning node).

### 2.3. Fuzzy $c$ -means (FCM)

Fuzzy  $c$ -means clustering is a process of grouping similar objects into the same class, but the resulting partition is fuzzy, which means that in this case images are not assigned exclusively to a single class, but partially to all classes. The goal is to optimize the clustering criteria in order to achieve a high intracluster similarity and a low intercluster similarity using  $p$ -dimensional feature vectors. The theoretical basis of these methods has been reported in detail elsewhere [15,16] and will only be briefly reviewed here.

Let  $X = \{x_1, x_2, x_3, \dots, x_n\}$  denote a set of  $n$  feature vectors in  $\mathcal{R}^p$ . The data set  $X$  is going to be partitioned into  $c$  fuzzy clusters, where  $1 < c < n$ . A  $c$ -partition of  $X$  can be represented by  $u_i(x_k)$  or  $u_{ik}$ , where  $u_{ik}$  is a continuous function in the  $[0,1]$  interval and represents the membership of  $x_k$  in the cluster  $i$ ,  $1 \leq i \leq c$ ,  $1 \leq k \leq n$ . In general  $[u_{ik}]$  can be denoted by a  $c \times n$  matrix  $U$  and must satisfy the following conditions:

$$\sum_{i=1}^c u_{ik} = 1, \quad (5)$$

$$0 < \sum_{k=1}^n u_{ik} < n. \quad (6)$$

The Fuzzy  $c$ -means algorithm consists of an iterative optimization of an objective function

$$J_m(U, v) = \sum_{k=1}^n \sum_{i=1}^c (U_{ik})^m D_{ik}, \quad (7)$$

where  $v = (v_1, v_2, v_3, \dots, v_c)$ , with  $v_i \in \mathcal{R}^p$  being the cluster center of class  $i$ ,  $1 \leq i \leq c$ , and:

$$D_{ik} = (d_{ik})^2 = \|x_k - v_i\|_A^2 \quad (8)$$

is the distance in the  $A$  norm from  $x_k$  to  $v_i$  ( $A$  is any positive definite  $p \times p$  matrix) and

$$\|x_k - v_i\|_A = (x_k - v_i)^T A (x_k - v_i). \quad (9)$$

In this work we used euclidean distance ( $A = I$ ). Other matrices are also possible.

The parameter  $m \in (1, \infty)$  determines the “fuzziness” of the partition. The performance of FCM is quite dependent of a good choice of  $m$ . Even if some studies have been carried out in order to find some good ways to find an optimum value of  $m$  [21], this choice still depends on the data under analysis and it is rather heuristic.

For a given partition, the cluster centers can be calculated as follows:

$$v_i = \frac{\sum_{k=1}^n (u_{ik})^m x_k}{\sum_{k=1}^n (u_{ik})^m}, \quad (10)$$

a new partition is obtained as

$$u_{ik} = \left[ \sum_{j=1}^c \left[ \frac{d_{ik}}{d_{jk}} \right]^{2/(m-1)} \right]^{-1}, \quad (11)$$

which completes one step of the algorithm. The iterative optimization of the objective function continues until a stopping criterion is met, usually when the euclidean distance between  $U$ -matrices at successive iterations falls below a threshold  $\varepsilon$  (successive iterations show little change), that is

$$E_t = \|U_t - U_{t-1}\|^2 < \varepsilon, \quad (12)$$

### 2.4. Fuzzy Kohonen clustering network (FKCN)

Fuzzy Kohonen clustering network [16] is a type of neural network that combines both methods described above: SOFM and FCM. The structure of this self-organization network model consists of two layers: input and output (no hidden layer is present). The input layer is composed of  $n$  nodes, where  $n$  is the number of features and the output layer is formed by  $c$  nodes, where  $c$  is the number of clusters to be found. Every single input node is fully connected to all output nodes with an adjustable weight  $v_i$  assigned to each connection. Given an input vector, the neurons in the output layer update their weights based on a pre-defined learning rate  $\alpha$ . This approach integrates the fuzzy membership  $u_{ik}$  from the FCM in the following update rule:

$$v_{i,t} = v_{i,t-1} + \alpha_{ik,t} (x_k - v_{i,t-1}), \quad (13)$$

where the learning rate  $\alpha$  is defined as

$$\alpha_{ik,t} = (u_{ik,t})^m, \quad (14)$$

$$m_t = (m_0 - t \Delta m), \quad (15)$$

where  $\Delta$

$$\Delta m = (m_0 - m_t)$$

Any other positive iteration. This ties:

- The learning rate and each neuron's distance has to be updated.
- FKCN causes justifying updates.
- FKCN SOFM FKCN the data.
- For a  $c$ -means.
- In the clustering.

The steps

1. Fix  $c$ ,  $\varepsilon = 0$ .
2. Initialize  $v_0 = t_{max}$ .
3. For  $t = 1$  to  $t_{max}$ :
  - (a) Compute  $u_{ik,t}$  using Eq. (14).
  - (b) Update  $v_{i,t}$  using Eq. (13).

$$v_{i,t} = v_{i,t-1}$$

where  $\Delta m$  can be

$$\Delta m = (m_0 - 1)/t_{\max}. \quad (16)$$

Any other values for  $\Delta m$  are possible.  $m_0$  is any positive constant greater than one,  $t$  is the current iteration and  $t_{\max}$  is the iteration limit.

This method shows several interesting properties:

- The learning rate  $\alpha$  is a function of the iteration  $t$  and its effect is to distribute the contribution of each input vector  $x_k$  to the next update of the neuron weights in an inverse proportion to their distance from  $x_k$ . The winner node (whose weight has the minimum distance from the input) updates its weight favored by the learning rate as the iteration increases. In this way the Kohonen concept of neighborhood size and neighborhood updating are embedded in this new learning rate.
- FKCN is a truly Kohonen-type algorithm, because it features a well-defined method for adjusting both the learning rate distribution and update neighborhood as function of time. Hence, FKCN inherits the “self-organizing” structure of SOFM-type algorithms.
- FKCN it's not sequential: different sequences of the data do not alter the results of the algorithm.
- For a fixed  $m_t > 1$  FKCN is a truly Fuzzy  $c$ -means algorithm
- In the limit ( $m_t = 1$ ), the update rule reverts to the classical Hard  $c$ -means rule (winners take all).

The steps for the algorithm are:

1. Fix  $c$ , and  $\varepsilon$  to any small positive constants (i.e.  $\varepsilon = 0.0001$ ).
2. Initialize the weight vector (cluster centers)  $v_0 = (v_{1,0}, v_{2,0}, \dots, v_{c,0})$ . Choose  $m_0 > 1$  and  $t_{\max}$ .
3. For  $t = 1, 2, \dots, t_{\max}$

(a) Compute all learning rates  $\alpha_{ik}$  as defined in Eq. (14).

(b) Update all weight vectors  $v_{i,t}$  with:

$$v_{it} = v_{i,t-1} + \frac{\sum_{k=1}^n \alpha_{ik,t} (x_k - v_{i,t-1})}{\sum_{s=1}^n \alpha_{is,t}}. \quad (17)$$

(c) Compute  $E_t$  for the stopping criterion as

$$E_t = \|v_t - v_{t-1}\|^2 = \sum_i \|v_{i,t} - v_{i,t-1}\|^2. \quad (18)$$

(d) If  $E_t \leq \varepsilon$  then stop else next  $t$ .

### 3. Results

We have tested the proposed method on two different data sets: one composed of the rotational power spectra of a large set of images and the other one composed directly by a set of images as described in materials and methods. In the first case each data had 15 components (15 first harmonics) and, therefore, the dimensionality of each data was not very high, however, the second data set was composed by images, which results into a potentially very high dimensionality problem. While techniques such a MSA or PCA could have been used for certain reduction of the dimension of the second data set, we have chosen instead to work directly with the images. The rationale has been aimed at testing our newly proposed method under very demanding conditions of large, noisy and high dimension data sets, a situation very common in electron microscopy image analysis.

#### 3.1. Experiment using rotational power spectra

##### 3.1.1. Results using fuzzy Kohonen clustering network (FKCN)

In this example, 2458 images from purified G40P protein samples were used for analysis. The rotational power spectrum [20] of each particle was calculated taking into consideration only the first 15 harmonics. Rotational symmetry analysis has been previously used in this field [22,23]. Some other improvements over using rotational spectra analysis for classification have also been proposed [24,25], specially for dealing with misalignment problems (invariant classification). However, these invariant methods suffer some problems [26], basically the phase information from the Fourier transform when calculating the double autocorrelation and double self-correlation functions is eliminated, therefore a classification of the invariants does not



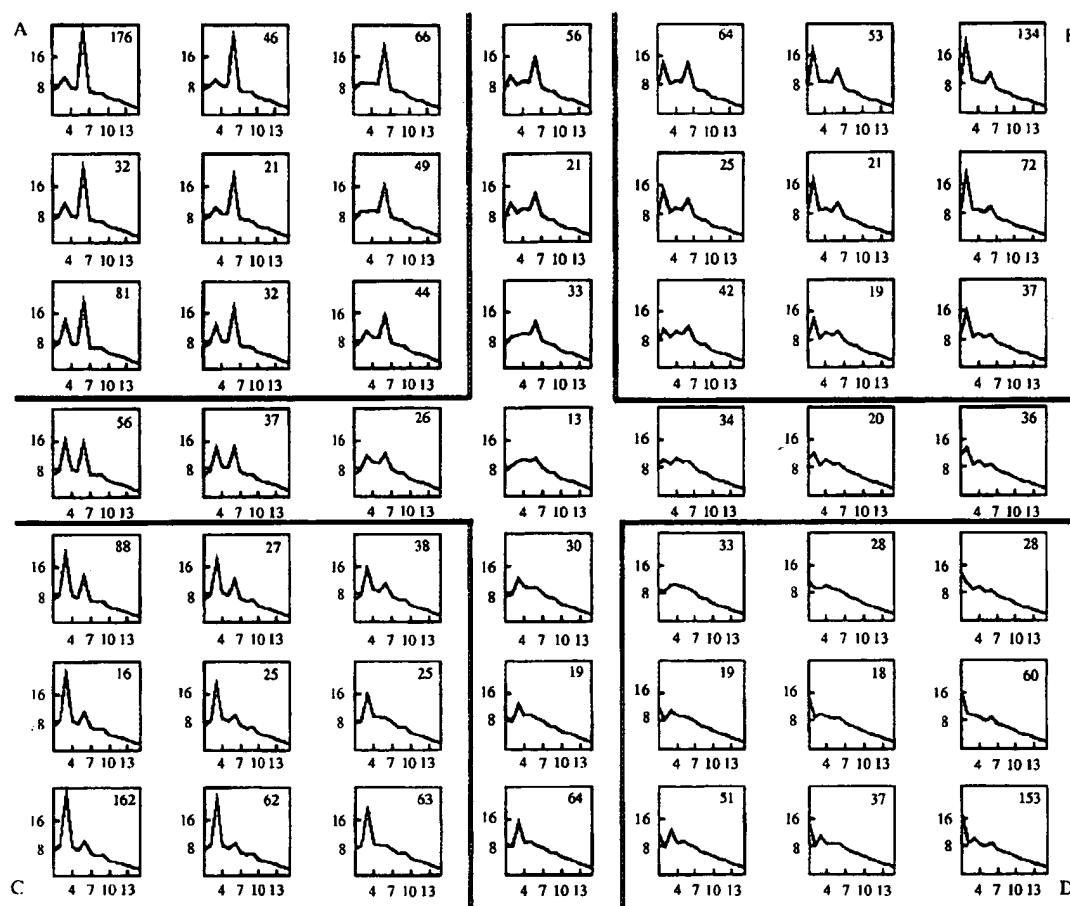


Fig. 2.  $7 \times 7$  SOFM output manually clustered into four regions. Group A: particles with a prominent 6-fold component and a small, but noticeable, 3-fold component. Group B: 2-fold symmetry. Group C: 3-fold symmetry and Group D: lack of a predominant symmetry. The number of elements assigned to each code vector is printed in the upper-right corner of each spectrum.

necessarily induce a correct classification of the images themselves. In our work, we deal with misalignment problems by doing several rotational and translational alignment steps previous to the determination of the rotational power spectra. Since only the first 15 harmonics were calculated, a 2458 15-dimensional data set was generated.

Repeating the steps followed in a previous work on the G40P helicase by Barcena et al. [19], a  $7 \times 7$  SOFM was applied to the data set and the resulting map was manually clustered into four classes. The results are shown in Fig. 2. Group A shows a predominant 6-fold symmetry with a small, but notice-

able, component on harmonics 3 that must be taken into account. Group B represents 2-fold symmetric images. Group C is closely related to 3-fold symmetric particles and Group D shows only a prominent harmonic in 1, which can be interpreted as a lack of symmetry in this group of images.

In the first experiment FKCN was applied to the whole set of particles' spectra, therefore it was used with the following configuration: 15 input nodes (each node representing a component in the spectrum) and 4 nodes in the output layer (representing four clusters). A partition into 4 clusters was carried

Fig. 3. Assigned a week symmetry

out in a new FKCN performed set to 500 iterations (cluster deduced the four successful 2 and shown difference is both 9 different should usually be bound to avoid. However and as exist at the SO FKCN FKCN include in group clusters spectra. Another carried purpose accord being

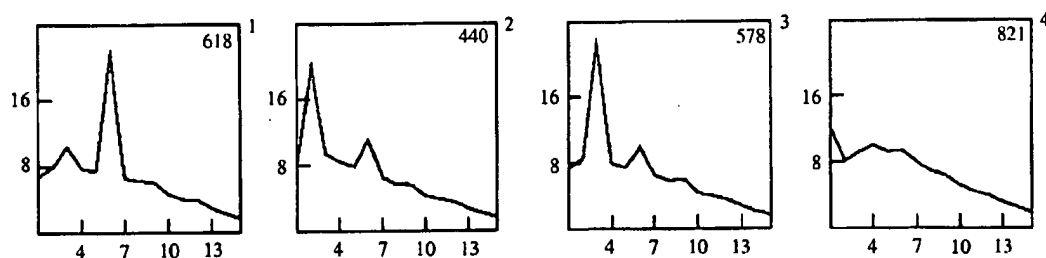


Fig. 3. Four cluster centers obtained from FKCN ( $m = 1.5$ , stopping criterion  $\epsilon = 10^{-6}$  and 500 iterations). The number of elements assigned to each cluster is printed in the upper-right corner of each spectrum. Cluster 1 presents a predominant 6-fold harmonic with a weak 3-fold one. Cluster 2 shows a predominant 2-fold harmonic. Cluster 3 shows a clear 3-fold symmetry and cluster 4 shows no symmetry at all.

out in order to compare the results obtained by the new FKCN with the results of the previous analysis performed in Ref. [19]. The fuzzy constant  $m$  was set to 1.5, stopping criterion  $\epsilon$  was set to  $10^{-6}$  and 500 iterations were used. The resulting code vectors (cluster centers) are shown in Fig. 3. As can be deduced from the observation of the cluster centers, the four groups visualized by the SOFM were also successfully extracted by FKCN (compare Figs. 2 and 3). Quantitative results of coincidence are shown in Table 1. As it is evident, a high coincidence is obtained for the four clusters obtained by both SOFM and FKCN. Nevertheless, a major difference in the sets extracted by both algorithms should be noticed. When SOFM output was manually clustered, a set of code vectors that were bounding the groups was not considered in order to avoid an erroneous classification at the borders. However, FKCN considered the whole data set and as a result of this difference in behavior, there exist a subset of the data that were eliminated from the SOFM that has been effectively classified by FKCN. To study how this subset was classified by FKCN, an additional group – Group E – has been included in Table 1. Clearly, the majority of images in group E has been now classified as belonging to cluster 4 (see Fig. 3), whose cluster center is a noisy spectrum with no discernible special features.

Another experiment using this data set was also carried out, but in this case and for comparison purposes, each spectrum was manually classified according to its most prominent harmonic without being presented to the SOFM. Essentially, the

Table 1  
Comparison between FKCN and SOFM.  $m = 1.5$ ,  $t$  (iterations) = 500<sup>a</sup>

| SOFM                 | FKCN      | Coincidence (%) |
|----------------------|-----------|-----------------|
| Group A              | Cluster 1 | 92.87%          |
| Group B              | Cluster 2 | 85.86%          |
| Group C              | Cluster 3 | 96.24%          |
| Group D              | Cluster 4 | 90.97%          |
| Group E <sup>b</sup> | Cluster 4 | 63.36%          |

<sup>a</sup> Coincidence is defined as the percent of the spectra that were classified in the same classes by both, manual clustering of SOFM map and FKCN.

<sup>b</sup> Group E is formed by the elements eliminated from the SOFM due to the fact of being at the borders of the clusters.

spectra were classified according to the almost predominant occurrence of harmonic 1, or 2, or 3, or 4, or 5, or 6, or, finally 7, as well as by the following sequence of frequent combinations:

- Combination 1: predominant 6 and a minor 3 (in this case 3 cannot be a harmonic of 6).
- Combination 2: predominant 6 with a high peak in 5 or in 7. This can be an error in the calculation of the spectrum because of the choice of the center that was used for the expansion of the image into the corresponding Fourier-Bessel functions [20].
- Combination 3: High 10- and 11-fold components (maybe noise).

A number of individual spectra were impossible to classify into the groups defined above and were

labeled as N, standing for (Noise). The interpretation of the rotational aspects of the data set is beyond the scope of this paper.

The comparison of the results of FKCN using four clusters and this manual classification of the spectra into the most typical harmonics was not obvious. While cluster 1 of FKCN matched very well (89.30%) with those spectra corresponding to the predominant occurrences of harmonic 6, cluster 2 of FKCN matched reasonably well (72.72%) with 2-fold spectra, and cluster 3 matched well (89.81%) with the 3-folded spectra, cluster 4 of FKCN – whose center in Fig. 3 presents a predominant 1-fold component – was formed by spectra which had been manually classified in different manners.

We have used four clusters in our data set in order to reproduce SOFM results, however, the fact that we obtained a cluster in which there is a mixture of manually classified spectra, tends to suggest that a partition into four clusters is not the best for this data set. The initial partition of the SOFM into four clusters was probably very influenced by the small size of the output array used in Ref. [19]. Indeed, for data with important variations among them, large output arrays are preferred, in order to have the needed flexibility in the network to follow the trends of variations in the input data (a point that will be addressed more in depth below). In this case, the initial SOFM analysis carried out using a  $7 \times 7$  output array was able to detect some of the more prominent trends of variability, but lacked the capability to detect subtle changes. In an effort to provide a systematic framework to the task of classifying large and complex data sets, in the following section a new tool operating on large SOFM output arrays will be presented as a way to detect detailed trends of variability.

### 3.1.2. Exploratory data analysis (EDA) and FKCN

Automatic determination of the number of clusters is known as cluster validity and it is a very complex topic in pattern recognition. It is known that most cluster validation approaches follow some assumptions about the data set and the algorithm used to generate the clusters [15,27–30]. Furthermore, it may be physically plausible to expect good and logical results using different number of

clusters, as the data are separated into increasingly finer substructures. Several classical and new cluster validity techniques have already been applied in the context of electron microscopy [5,27], and some of them (partition coefficient, partition entropy, non-fuzzy index, compactness and separation index and Moreau and Jain functional) were also used with these data sets, although, they did not provide conclusive results: most of them suggested the use of two clusters. This behavior was expected because these functionals give their optimal values when clusters are compact and well separated, situation rarely found in real situations.

In this work we present a different approach to cluster analysis by using SOFM for the task of visual exploratory data analysis [31–34]. Due to its learning algorithm the SOFM forms a non-linear regression of the ordered set of output vectors (neurons) into the input space. In fact, it can be considered that the two-dimensional grid of output vectors acts like an “elastic network” that follows the distribution of the data [10]. The ordered nature of this regression justifies the use of the SOFM as a display for data items, this is so because nearby output neurons will have similar data mapped onto them, so the density of vectors of an organized map will be an approximate reflection of the density of the input samples [10,35]. In this way, the cluster structure of the data can be visually detected by an appropriate display of the distances between the reference vectors (code vectors) of neighboring neurons in the map. One of the simplest method [31,36,37] is to sum up the distances of code vectors of adjacent neurons. Summing up the so-calculated distances gives a measure of dissimilarity between the neurons in the  $p$ -dimensional input space. The distances can be displayed for example as heights, giving a landscape appearance or coding different colors (gray levels). We used the latter in this work.

For this purpose we have used a self-organizing map of  $64 \times 64$  neurons arranged in a rectangular lattice. The choice of the optimal map's parameters is a difficult task, so we decided to generate 10 different map configurations and use the minimum weighted quantization error as the selection criterion as suggested in Ref. [10]. Fig. 4 shows the distances between neighboring neurons on the

resulting  
degree  
gaps be  
this ap  
as sug  
called  
are fir

Fig. 4.  
neuron  
ing to n  
each gr  
(see Fig

Fig. 5.  
assigned

resulting map. Light areas represent zones of high degree of clustering, while dark areas represent gaps between clusters. It should be noticed that in this application SOFM was trained in two stages, as suggested by Kohonen [10]. The first stage is called the “ordering phase”, where the code vectors are first ordered, for this purpose a large initial

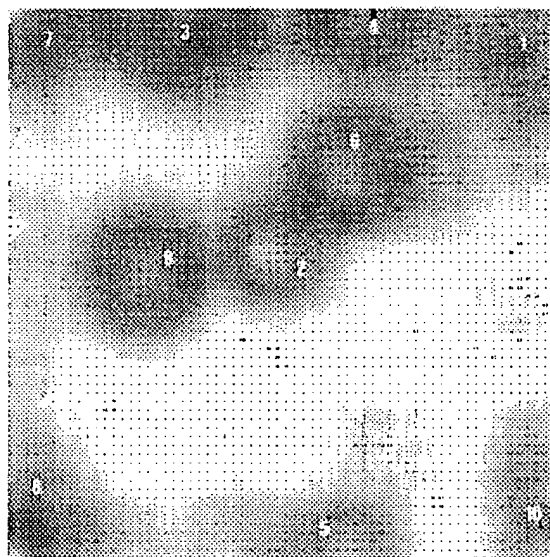


Fig. 4. Display of a  $64 \times 64$  square SOFM. The label of each neuron coincides with the label of the closest spectrum according to manual classification previously carried out. The label of each group is arbitrary and indicates the number of the cluster (see Fig. 5).

neighborhood radius (usually the whole neighborhood) and a large learning rate is used. In this case initial radius ( $R_0$ ) was set to 64 and initial learning rate ( $\alpha_0$ ) was set to 0.05. One thousand iterations were used. The second phase is used for fine-tuning the code vectors, hence a smaller initial neighborhood radius and a smaller learning rate are used ( $R_0$  was set to 4 and  $\alpha_0$  was set to 0.03). Five thousand iterations were used during this phase. Because of the very small neighborhood radius used in the second run, the resulting map was not very smooth; in this way “compact clusters” with a small light area inside a black border were obtained. There is also a big white area in the map where virtually no images have been assigned, this is therefore a zero-density zone which was obviously not included in the analysis.

The visual inspection of the map suggested the use of 10 clusters for new computations and Fig. 5 shows the 10 cluster centers obtained when applying FCKN with  $m = 1.5$ , stopping criterion  $\varepsilon = 10^{-6}$  and 500 iterations.

The interpretation of these new results, as well as the comparison with the manual classification is as follows:

**Cluster 1:** 100% of coincidence. This cluster showed 232 individual spectra with a high and predominant 6-fold symmetry, there is a full coincidence with the manual classification.

**Cluster 2:** This cluster is composed of a mixture of spectra with the common property of having a predominant peak in the 6 component but with

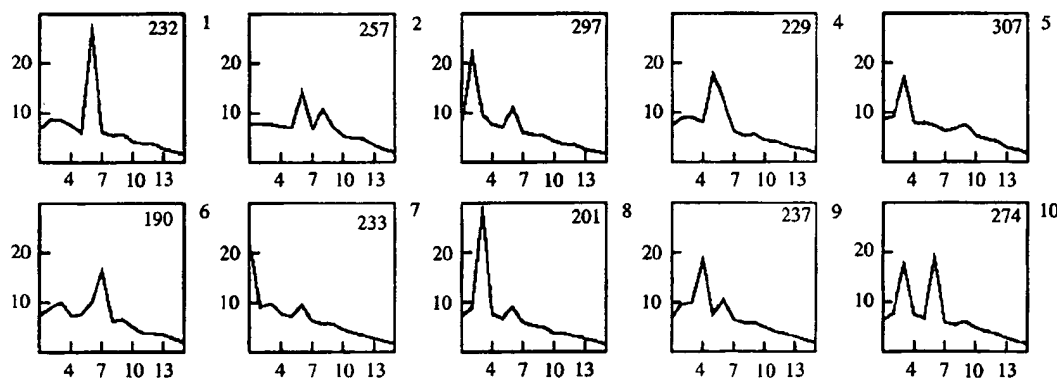


Fig. 5. Ten cluster centers obtained from FCKN ( $m = 1.5$ , stopping criterion  $\varepsilon = 10^{-6}$  and 500 iterations). The number of elements assigned to each cluster is printed in the upper-right corner of each spectrum.

high peaks at others components like 8 and 9. 54.86% of the spectra was manually classified as 6 with components at 4, 8 and 9, 26.84% was classified as 8-fold symmetry and the rest is noise (peaks everywhere). This group can be considered as a noisy 6-fold symmetric subset that because of being so populated requires special treatment (it could then be a candidate for an even finer degree of classification).

*Cluster 3:* 99.66% of coincidence. 297 spectra showed a high 2-fold component. 296 matched with manual classification.

*Cluster 4:* 82.09% of coincidence. This cluster is composed of 229 spectra and shows a clear 5-fold symmetry, 188 matched the manual classification. By looking at the individual cases of the spectra falling in this cluster, it could be noticed that a high component in 6 is also present. This effect in the spectrum could be produced by a wrong alignment of 6-fold symmetric images. The wide peak around the 5 component in the cluster center corroborates this. By looking at the 41 individual spectra that were incorrectly assigned to this cluster, it could be noticed that 28 of them were manually classified as 6-fold symmetry, however, in most of them a big component in 5 is also present.

*Cluster 5:* 85.34%. This cluster is composed by 307 spectra and shows a 3-fold symmetry, 262 of them matched the manual classification. As it is clearly shown in the cluster center, a predominant but not very high 3-fold component, with a noticeable harmonic in 9, is detected. However, by analyzing individual spectra of erroneously classified data, all of them were manually classified either as Noise or 1-fold symmetry, although they also presented high 3 and 9 components, which explain the classification into this group.

*Cluster 6:* 74.73% of coincidence. This cluster is formed by 190 7-fold symmetric spectra, and 142 of them coincided with manual classification. Similarly to Cluster 4, a high peak around 6 was also noticed in the whole set of data falling in this cluster. 17 cases that were incorrectly classified as 7-fold symmetry were manually classified as 6-fold symmetry. Again, the images whose spectra were classified in this cluster could be incorrectly aligned producing this subset of 7-fold symmetry. (See also the wide peak around 7 in the cluster center.)

*Cluster 7:* 100%. 233 spectra were classified as 1-fold symmetry (maybe a lack of clear rotational symmetry in the images). All of them matched with manual classification.

*Cluster 8:* 100%. 201 spectra showed a high and predominant 3-fold symmetry. All of them matched with manual classification.

*Cluster 9:* 94.51%. 237 spectra were classified as 4-fold symmetry, 224 of these matched with manual classification.

*Cluster 10:* 100% of coincidence. This cluster holds an interesting group of 6-fold and 3-fold symmetric images. There are 274 spectra in this cluster, where the 58.39% were manually classified as 6- and 3-fold symmetry (in this case 3 is not a harmonic of 6), the rest was manually classified as 3-fold but with a very high 6 component.

### 3.2. Experiment using 3- and 6-fold symmetric images

In this experiment, 338 images representing high-dimensional data and very noisy data were used for testing the algorithms. In this case all these images share similar rotational symmetry (6-fold with a minor 3-fold component) and belong to Group A of the former rotational symmetry experiments, see Ref. [19] for details. Classification of this kind of particle is very difficult because of the low signal/noise ratio and the apparent structural similarity of the population. Two representative images from this data set are shown in Fig. 1.

For comparison purposes with previous work [19], a  $7 \times 7$  SOFM was applied to the data set and the resulting map was manually clustered in two different classes that visually exhibited an opposite handedness. This result is shown in Fig. 6, where the SOFM was clustered in two classes whose main difference is in the handedness of the periphery of the particles.

In the first experiment using FCKN we clustered the data set into two clusters in order to reproduce the results obtained by SOFM (different values for  $m$ , stopping criterion  $\epsilon$  and iterations were used). However, FCKN could not find two clusters related only to variations in handedness of the particle as obtained by SOFM. Fig. 7 shows the cluster centers and the average images belonging to both

B

Fig. 6.  
with d  
each o  
image

Fig. 7.  
stopping  
age im

cluster  
ture o  
In  
distr  
for ex  
from  
sizes.

classified as  
r rotational  
atched with

l a high and  
em matched

classified as  
with manual

This cluster  
and 3-fold  
ctra in this  
lly classified  
se 3 is not  
classified as  
nt.

metric

representing  
y data were  
ase all these  
etry (6-fold  
1 belong to  
etry experi-  
ation of this  
e of the low  
uctural sim-  
entative im-  
fig. 1.

vious work  
data set and  
ered in two  
an opposite  
fig. 6, where  
whose main  
periphery of

we clustered  
o reproduce  
nt values for  
were used).  
clusters re-  
s of the par-  
vs the cluster  
ging to both

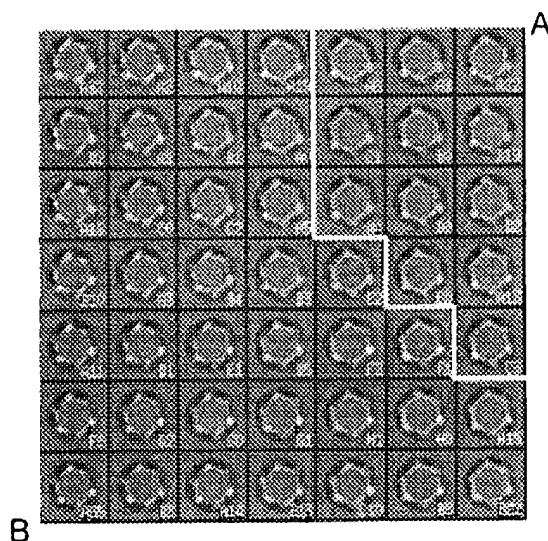


Fig. 6.  $7 \times 7$  SOFM output visually clustered in two regions with different handedness. The number of particles assigned to each code vector is printed in the lower-right corner of each image.

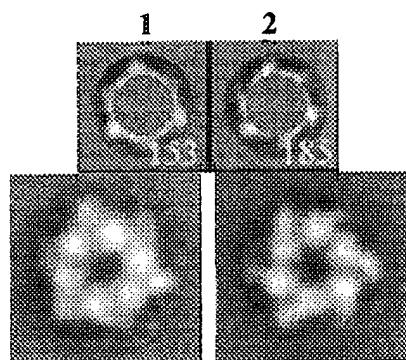


Fig. 7. Top: two cluster centers obtained from FKCN ( $m = 1.5$ , stopping criterion  $\epsilon = 10^{-6}$  and 500 iterations). Bottom: Average images of the particles assigned to each cluster.

clusters. It is evident that cluster 1 contains a mixture of particles with different handedness.

In order to get a better idea of the underlying distribution of this data set, we again used SOFM for exploring the data. A  $15 \times 7$  map was selected from 10 different candidate maps with different sizes, using the quantization error as the selection

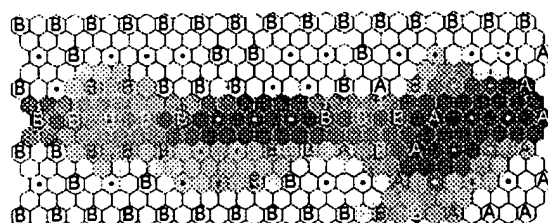


Fig. 8. Display of a  $15 \times 7$  hexagonal SOFM. The label of each unit coincides with the label of the closest image according to visual classification previously carried out by SOFM.



Fig. 9. Three cluster centers obtained from FKCN ( $m = 1.5$ , stopping criterion  $\epsilon = 10^{-6}$  and 500 iterations). The number of particles assigned to the cluster is printed in the lower-right corner of each image.

criterion. The resulting map was again trained in two phases. In the ordering phase the radius ( $R_0$ ) was set to 13 and initial learning rate ( $\alpha_0$ ) was set to 0.05. 1000 iterations were used. The fine-tuning phase was carried out with  $R_0$  set to 7,  $\alpha_0$  set to 0.03 and 5000 iterations. Fig. 8 shows the distance matrix of the resulting map.

The distance map suggested a distribution of the data in three apparently homogeneous clusters (light areas in the map). Group A obtained by visually clustering of the  $7 \times 7$  map is clearly isolated in this  $15 \times 7$  map, however, Group B seems to be composed by two different classes. We then clustered the data set with FKCN into three groups using  $m = 1.5$ , stopping criterion  $\epsilon = 10^{-6}$  and 500 iterations. Cluster centers obtained are shown in Fig. 9. Classification accuracy is also shown in Table 2.

Analyzing the results of the algorithm with three clusters. It is clear that FKCN now correctly clustered Group A in SOFM, since this group is accounted for by cluster 3, however, Group B has been split into clusters 1 and 2. Then a question arises: why FKCN needed three clusters to "find"

this structure of the data? The answer can be found by analyzing the particles assigned to these clusters. The images from the three classes were independently realigned to obtain their average. Fig. 10 shows the average image and rotational spectra of subsets belonging to each cluster. In the case of cluster 3, a counterclockwise handedness is clearly observed which is in agreement with group A of SOFM. In the case of clusters 1 and 2 the average images show the same handedness (which in this case is clockwise) in agreement with Group B of SOFM. However, even if the handedness is the same for clusters 1 and 2, a deeper analysis reflects differences in the rotational symmetry spectra between these two clusters. To be precise, both of them have a predominant 6-fold symmetry, but

cluster 2, as oppose to cluster 1, is influenced by a noticeable 3-fold component. This very subtle difference could not be visually detected in the SOFM classification carried out in Ref. [19], and probably explains the need to use three clusters for the run of FKCN. Indeed, these new results indicate that there are two trends of variability in this data set, symmetry and handedness, that naturally were better handled by classifying the particles into three classes than into two. This small symmetry variation in the data set may also be the cause of misclassification obtained when using two clusters: symmetry was influencing the results more than handedness.

### 3.3. Fuzzy *c*-means algorithm

Fuzzy *c*-means clustering algorithm (FCM) was also tested on both data sets in order to compare its performance with FKCN. In both cases several parameters were tried: fuzzy constant (ranging from 1.1 up to 5), iterations (ranging from 500 up to 10000), termination criteria (stopping when changes of cluster center values fell below 0.000001 and stopping when all iterations were completed), number of clusters (ranging from 2 up to 10) and different cluster centers initializations (random, zero and using the values of some randomly selected feature vectors). Not acceptable results were

Table 2

Comparison between FKCN and SOFM in image classification.  $m = 1.5$ .  $t$  (iterations) = 500\*

| FKCN      | SOFM    |        |
|-----------|---------|--------|
| Cluster 1 | Group B | 93.23% |
| Cluster 2 | Group B | 96.15% |
| Cluster 3 | Group A | 89.3%  |

\*Coincidence is defined as the percent of the images that were classified in the same classes by both, manual clustering of SOFM map and FKCN.

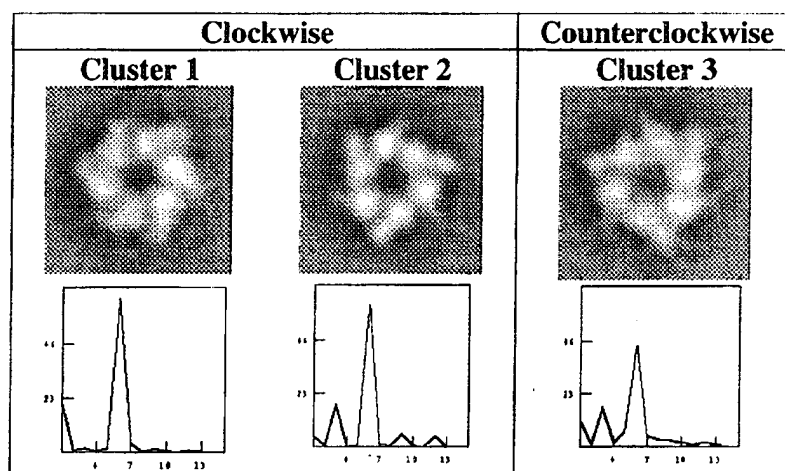


Fig. 10. Average Images and rotational spectra of clusters derived by FKCN.

obtained a great fuzzy clusters (with groups, rhythm, only selected FCM even early to give iter the algorithm

### 4. Disc

In the has been mens by a spectrohobines the and the

The ing with electro propos of two propos bership while it ture of robust structu

In the of the s as the carried self-org some of function allow vectors At the very us a better the dis

influenced by very subtle results in the [19], and clusters for results indistinguishability in this at naturally articles into 11 symmetry the cause of two clusters: more than

(FCM) was compare its cases several ranging from 500 up to when chaotic (0.000001 and completed), to 10) and is (random, randomly selected results were

obtained. In the case of the rotational spectra, a great instability was observed when varying the fuzzy constant, and only the 6- and 3-fold symmetries (which corresponded to the most populated groups) were approximately detected by the algorithm, while the rest of the clusters were erroneously selected. When using the image pixels directly, FCM was unable to detect any cluster tendency, even with different parameters. In both cases an early termination was observed (changes at successive iterations fell below a threshold), meaning that the algorithm probably converged to a local minimum far away from the optimal solution.

#### 4. Discussion and conclusion

In this paper, a new fuzzy classification technique has been applied to the study of biological specimens by electron microscopy. This technique uses a special type of Neural Network named fuzzy kohonen clustering network that successfully combines the well-known self-organizing feature maps and the fuzzy *c*-means clustering technique.

The need of classification tools suitable for working with large sets of noisy images is evident in the electron microscopy field. In this work we have proposed a new approach which is the combination of two methods already applied in this context. The proposed method combines the ideas of fuzzy membership values for calculating the learning rates, while it has the parallelism of FCM and the structure of the update rules of SOFM, producing a robust clustering technique with a self-organizing structure.

In this work we have stressed the importance of the selection of good parameters in SOFM, such as the size of the output grid. The experiments carried out showed that using small and square self-organizing map on large data sets might lose some details of the mapped probability density function (pdf), suggesting the use of a larger map to allow the "elastic network" formed of the code vectors to be oriented along with the pdf. [10]. At the same time, large self-organizing maps are very useful for exploring the data sets and getting a better idea of the data distribution by showing the distances between neighboring neurons of the

map [31,32] in the framework of exploratory data analysis.

EDA is a set of tools for illustrating the intrinsic structure in any statistical data set, its main goal is to present a data set in a such a way that it can be easily understandable and at the same time preserve the essential information of the original data set. SOFM is a method that combines both, projection and clustering, two very important features for exploration. However, even if in some cases the clustering structure is evident, the border between clusters is not easy to determine, for that reason in this work we proposed the use FKCN for the automatic extraction of clusters once we know the number of clusters in the data set by previous exploration. SOFM has been successfully applied in visually exploring large data sets in other context [32,33], but to the best of our knowledge; this is the first time that this kind of exploration is used in large image data sets.

FKCN have been fully tested in this work using two kinds of data sets that are very common in many Electron Microscopy studies: the rotational power spectra and the images of individual particles (In this case images of the G40P helicase were used). In both cases FKCN was able to discriminate both, evident and subtle variation in the data set. It should be noted that detailed analysis like the one carried out in this work allows a finer characterization of big data sets. For instance, in the case of the rotational spectra where 10 apparent clusters were extracted, it is obvious that some of the clusters were produced by a wrong rotational alignment of the images (clusters 4 and 6), the images assigned to those clusters could be re-aligned again to be used as part of other groups. Similarly, noisy images (the ones labeled with 1 or Noise) can definitely be excluded from the population. Clusters like 5 and 9 could be merged because both of them represent 3-fold symmetric particles, although with some intrinsic differences. The same occurs with clusters 1 and 2 (6-fold symmetry), but the decision could be taken after a detailed analysis of those individual clusters. The results demonstrate the suitability of this method for working with these kind of high-dimensional and noisy data sets.

It is important to note that FKCN can also be considered as an optimization algorithm like FCM,



so the possibility of falling into local minimum before converging to the solution is present. However, the experiments carried out in this work show that FKCN has properly converged in all the analyzed cases. On the contrary, FCM fell in a local minimum with these data. The explanation of this behavior can be found in the good properties of the self-organization structure of the FKCN algorithm.

It is also important to point out that FKCN makes assumptions concerning the shape of the clusters. These assumptions are implicit in the distance function used (hyperspherical shape if euclidean distance is used). However, in practical situations, the clusters' shape is not always hyperspherical. Furthermore, the use of SOFM as a previous exploration step before clustering might be problematic in some special cases due to the fact that the non-linear mapping carried out by SOFM might distort the real shape of the clusters. In future work several other clustering approaches are going to be explored to partially solve this problem, specially those that make no assumptions about the shape of the clusters.

Comparing this clustering approach with others previously proposed in the field for structure-based classification, we should emphasize that this method, like SOFM, directly performs a classification (assignment of data to cluster centers), while at the same time offers a direct visualization by inspecting the cluster centers. Also, the fuzzy nature of the algorithm allows a better classification of input data to clusters, in this way confusing data (e.g. input vectors that fall in the border of two clusters) can be assigned to the one which higher fuzzy membership or they can even be excluded from the population to avoid classification mistakes.

We propose that this type of neural computation approaches (self-organizing networks) properly combined with FKCN can be successfully employed for exploration of data and classification in the electron microscopy field.

#### Acknowledgements

The developments described here have been partially supported by the Spanish Plan Nacional de

Biotechnologia through grant number BIO 98-0761. We would also like to thank Prof. Noel Bonnet from INSERM Unit 314 and University of Reims (LERI) for his comments on the present work, the relationship with him having been supported by the lateral Spanish–French travel grant No. HF 1998-0065.

#### References

- [1] M. Van Heel, J. Frank, *Ultramicroscopy* 6 (1981) 187.
- [2] J. Frank, M. Van Heel, *J. Mol. Biol.* 161 (1982) 134.
- [3] M. Van Heel, *Ultramicroscopy* 13 (1984) 165.
- [4] J. Frank, J.P. Betraudiere, J.M. Carazo, A. Verschoor, T. Wagenknecht, *J. Microsc.* 150 (1988) 99.
- [5] J.M. Carazo, F.F. Rivera, E.L. Zapata, M. Radermacher, J. Frank, *J. Microsc.* 157 (1990) 187.
- [6] M. Herbin, N. Bonnet, P. Vautrot, *Pattern Recognition Lett.* 17 (1996) 1141.
- [7] N. Bonnet, *J. Microsc.* 190 (1998) 2.
- [8] R. Marabini, J.M. Carazo, *Biophys. J.* 66 (1994) 1804.
- [9] H. Zuzan, J.A. Holbrook, J.A. Kim, G. Harauz, *Optik* 109 (1998) 181.
- [10] T. Kohonen, *Self-Organizing Maps*, 2nd edition, Springer, Berlin, 1997.
- [11] H. Zuzan, J.A. Holbrook, P.T. Kim, G. Harauz, *Ultramicroscopy* 68 (1997) 201.
- [12] H.P. Simon, *Artif. Neural Networks* 2 (1992) 1573.
- [13] T. Villmann, R. Der, M. Herrmann, T.M. Martinetz, *IEEE Trans. Neural Networks* 8 (1997) 256.
- [14] R. Bellman, *Adaptive Control Processes: A Guided Tour*, Princeton University Press, Princeton, NJ, 1961.
- [15] J.C. Bezdek, *Pattern Recognition with Fuzzy Objective Function Algorithms*, Plenum Press, New York, 1984.
- [16] E. Chen Kuo Tsao, J.C. Bezdek, N.R. Pal, *Pattern Recognition* 27 (1994) 757.
- [17] Jin Shin Chou, Chin-Tu Chen, Wei-Chung Lin, *Image Process* 1998 (1993) 220.
- [18] L.A. Diago, A. Pascual, A. Ochoa, A genetic algorithm for automatic determination of the Cup/Disc ratio in eye fundus images. *Proceedings TIARP'98*, Mexico, 1998, pp 461–472.
- [19] M. Barcena, C. San Martin, F. Weise, S. Ayora, J.C. Alonso, J.M. Carazo, *J. Mol. Biol.* 283 (4) (1988) 809.
- [20] R.A. Crowther, L.A. Amos, *J. Mol. Biol.* 60 (1971) 123.
- [21] H. Choe, J. Jordan, On the optimal choice of parameters in a fuzzy c-means algorithms. *Proceedings of the First IEEE Conference on Fuzzy Systems*, San Diego, 1992.
- [22] E. Kocsis, M.E. Cerritelli, B.L. Trus, T. Cheng, A.C. Steven, *Ultramicroscopy* 60 (1995) 219.
- [23] G. Harauz, *Micron* 29 (1998) 161.
- [24] M. Schatz, M. van Heel, *Ultramicroscopy* 32 (1990) 255.
- [25] M. Schatz, M. van Heel, *Ultramicroscopy* 45 (1992) 15.

- [26] J. F. Mac
- [27] F.F. tion
- [28] R.C.
- [29] R.C. 235.
- [30] B.S.
- [31] A. U. map
- [32] S. K. Acta ing Dr. T. Finl

BIO 98-0761.  
Noel Bonnet  
ity of Reims  
nt work, the  
orted by the  
o. HF 1998-

5 (1981) 187.  
1982) 134.  
165.  
.. Verschoor, T.

Rademacher, J.

rn Recognition

1994) 1804.  
rauz. Optik 109

lition, Springer,

rauz, Ultramic-

92) 1573.  
fartinetz, IEEE

, Guided Tour,  
, 1961.  
uzzy Objective  
York, 1984.  
Pattern Recog-

ng Lin, Image

c algorithm for  
c ratio in eye  
exico, 1998, pp

S. Ayora, J.C.  
(1988) 809.  
0 (1971) 123.  
f parameters in  
the First IEEE  
1992.  
. Cheng, A.C.

opy 32 (1990)

45 (1992) 15.

- [26] J. Frank, Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies, Academic Press, New York, 1996.
- [27] F.F. Rivera, E.L. Zapata, J.M. Carazo, Pattern Recognition Lett. 11 (1990) 7.
- [28] R.C. Dubes, J. Pattern Recognition 20 (1987) 645.
- [29] R.C. Dubes, A.K. Jain, J. Pattern Recognition 11 (1979) 235.
- [30] B.S. Everit, J. Biometrics 35 (1979) 169.
- [31] A. Ultsch, H.P. Siemon, Kohonen's self organizing feature maps for exploratory data analysis. Proceedings of ICNN'90, International Neural Network Conference, 1990, pp. 305.
- [32] S. Kaski, Data exploration using self-organizing maps, Acta Polytechnica Scandinavica, Mathematics, Computing and Management in Engineering Series No. 82, Dr.Tech. Thesis, Helsinki University of Technology, Finland, 1997.
- [33] S. Kaski, T. Kohonen, Exploratory data analysis by the self-organizing map: Structures of welfare and poverty in the world, in: A.-P.N. Refenes, Y. Abu-Mostafa, J. Moody, A. Weigend (Eds.), Neural Networks in Financial Engineering, World Scientific, Singapore, 1996, pp. 498–507.
- [34] S. Kaski, J. Nikkilä, T. Kohonen, Methods for interpreting a self-organized map in data analysis, in: M. Verleysen (Ed.): Proceedings of ESANN'98, 6th European Symposium on Artificial Neural Networks, Brussels, 1998 pp. 185–190.
- [35] H. Ritter, IEEE Trans. Neural Networks 2 (1991) 173.
- [36] A. Ultsch, Knowledge extraction from self-organizing neural networks, in: O. Opitz, B. Lausen, R. Klar (Eds.), Information and Classification, Springer, Berlin, 1993, pp. 309–313.
- [37] M.A. Kraaijveld, J. Mao, A.K. Jain, IEEE Trans. Neural Networks 6 (1995) 548.

STIC-ILL

From: Zeman, Mary  
Sent: Friday, November 22, 2002 9:56 AM  
To: STIC-ILL  
Subject: References 09/707703

421630

Please send a copy of the following articles

Thank you

Mary K. Zeman

Examiner, 1631

305-7133

CM1 12A17

mailbox: CM1 12D01

Weber, J.E. et al., "Fuzzy Reasoning, Possibility Theory and Probability Theory in Expert Systems for Histopathology", IEEE/Ninth Annual Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society, pp. 1560-1562, .COPYRGT.1987.

SO SPIE proceedings series, (1999), 3544, 110-120, 12 refs.

Conference: Pathogen detection and remediation for safe eating.

Conference, Boston MA (United States), 5 Nov 1998

ISSN: 1017-2653

SO Ultramicroscopy, (July, 2000) Vol. 84, No. 1-2, pp. 85-99. print.

ISSN: 0304-3991.

SO IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B: Cybernetics, (1998), 28(4), 583-591, 27 refs.

ISSN: 1083-4419 CODEN: ITSCFI

SO Biotechnology and bioengineering, (1995), 48(1), 1-11, 36 refs.

ISSN: 0006-3592 CODEN: BIBIAU

# FUZZY REASONING, POSSIBILITY THEORY, AND PROBABILITY THEORY IN EXPERT SYSTEMS FOR HISTOPATHOLOGY

J. E. Weber,\* P. H. Bartels,\*\* and G. L. Wied\*\*\*

\*Dept. of Statistics, University of Arizona

\*\*Optical Sciences Center and Dept. of Pathology, University of Arizona

\*\*\*Dept. of OB-GYN and Dept. of Pathology, University of Chicago

## ABSTRACT

Decisions in diagnostic cytology, whether made by human diagnosticians or expert systems, involve uncertainty. The study examines ways in which the design of a diagnostic expert system may consider uncertainty resulting from inherent randomness of a process—e.g., the expression of a diagnostic clue—and uncertainty attributable to the vagueness in the assessment of a diagnostic clue by the diagnostician. The appropriate use of probability theory, and of the theory of possibility for modeling either kind of uncertainty is discussed.

## INTRODUCTION

Whether made directly by pathologists or by expert systems, real-world diagnostic decisions involve uncertainty. An important aspect of expert systems design is developing a plausible model of human reasoning concerning uncertain situations. Consequently, expert systems research has become a focus for developing methods for handling uncertainty.

There are many approaches for dealing with uncertainty [1]. The techniques used in expert systems are referred to as parallel certainty inferences, because they involve calculating the uncertainty of an uncertain inference. These methods include, for example, Bayesian theory and Dempster-Shafer theory, which are based on probabilities, and certainty factors and endorsements, which are based on possibilities.

## PROBABILITIES AND POSSIBILITIES IN DIAGNOSIS

At least two types of uncertainty must be considered in designing diagnostic expert systems: uncertainty in the diagnostic clues which results from inherent randomness and uncertainty attributable to vagueness or "fuzziness" in the diagnostician's perception or judgment. Probability theory is an appropriate basis for modeling the first type of uncertainty; fuzzy sets and associated theory of possibility are more appropriate for modeling the second type of uncertainty [2].

Probabilities and possibilities differ with respect to both their methods of assessment and their mathematical properties. Probability assessment is based on the concept of relative frequency, e.g., of the occurrence of a given pathologic condition. Possibility of membership in a fuzzy set is based on non-additive measures associated with the imprecision or vagueness that is characteristic of human perception and linguistic description.

The treatment of fuzziness is a critical issue in knowledge representation. Saying that a diagnostic category, such as "moderately dysplastic cell" in cervical cytology, is fuzzy implies that sometimes it is not possible to determine whether the category applies in a particular case. It is important to note that this indeterminacy is associated with some aspect of the attribute "moderately," not with lack of knowledge. It is this indeterminacy with which possibility theory is concerned. The fuzzy set approach provides a formal basis for representing and dealing with numerical and linguistic variables in a uniform way. This approach involves *approximate* reasoning, which consists of drawing conclusions by taking into account the consistency of the facts.

The concepts of fuzzy sets, fuzzy logic and possibility theory are very useful in designing expert systems. In many cases, although the value of a particular attribute, such as "moderate," is not known precisely, it can be restricted by a possibility distribution which models the fact that certain values of the attribute are impossible (dysplasia absent, so moderate dysplasia is ruled out) and some values are more possible than others (such as in severe dysplasia). Fuzzy sets of elements necessarily having or not having a specified property and fuzzy sets of elements possibly having a specified property can be defined easily in this framework. When the fuzzy evaluations of alternatives overlap, e.g., severe dysplasia and carcinoma in situ, it cannot always be determined that one alternative is definitely preferable to (or more likely than) another. However, it can be determined to what extent the fuzziness of the data prevents the complete ranking of a set of alternatives.

The conceptual and mathematical foundations of the probabilistic and the possibilistic approaches are quite different. The probabilistic method requires the diagnostician to assess the probability that an event has a particular relative frequency of occurrence, based on his idea of the likelihood of the event. In contrast, in the fuzzy set theoretic approach an attempt is made to model the likelihood. Vagueness of categories, rather than probabilistic uncertainty, is used as the basis for assessing the degree to which a particular relative frequency is associated with the expert's concept of likelihood.

While both possibilistic and probabilistic uncertainty are assessed on the range zero to one, they have different properties. The possibility associated with a subset is the maximum possibility of the elements in that subset. The probability associated with a subset is the sum of the probabilities associated with the elements in the subset. Also, the sum of the probabilities over a sample space must equal

one; in general, a sample space is not defined for possibilities.

In fuzzy set theory, the approximation of continuous to discrete possibility distributions is a trivial matter; max and min operations are effected at discrete points, rather than continuously, as in the case of probability distributions. Thus, from a technical point of view, the mathematics required for dealing with the vagueness associated with fuzzy set theory is less involved than that required for obtaining Bayesian confidence intervals.

To deal effectively with uncertainty and imprecision in designing diagnostic expert systems, both possibility and probability are needed. Several methods for each have been proposed; these include Bayesian theory and Dempster-Shafer theory which are based on probabilities, and endorsements and certainty factors which are more compatible with a fuzzy set formulation of uncertainty.

#### THE PROBLEM OF WEIGHING DIAGNOSTIC EVIDENCE

Whether uncertainty is represented in terms of probabilities or possibilities, rules for weighing evidence pro and con a hypothesis must be specified. The Bayesian approach inherently permits consideration of both pro and con evidence in computing the probability of an uncertain hypotheses. Essentially, Bayesian analysis provides a simple mathematical method for updating the probability of a hypothesis given the observation of a diagnostic clue. Unfortunately, in practical diagnostic situations the Bayesian assumptions of mutually exclusive and exhaustive hypotheses and conditional independence of the evidence in a hypothesis may often be difficult to justify.

Bayesian analysis also has the limitation that it does not take into account uncertainty in the diagnostic evidence itself. It permits no uncertainty in the premise, only in the conclusion. Thus it is not possible to distinguish between a probability directly calculated from evidence and a probability indirectly inferred from an absence of evidence. For example, if no crowded glandular cells are observed in a colon tissue section, the diagnostician might conclude that the probability of a diagnosis of adenoma is, say, 0.02. On the other hand, if a patient belongs to a low risk category, the probability of adenoma may also be assessed as 0.02 on that basis. The two assessments are treated in the same way in Bayesian analysis, whereas in a fuzzy set analysis, they would be stated as diagnostic rules with associated attenuation factors. Also, a Bayesian probability combines reasons for believing with reasons for not believing, when it might be preferable to keep them separable.

Dempster-Shafer theory, like Bayesian theory, uses degree of belief to represent uncertainty. It differs from the Bayesian approach in that a distribution is constructed over subsets of hypotheses, rather than over an individual (single) hypothesis, thus making it possible to distinguish between uncertainty and ignorance. A rule for combining two pieces of evidence and their probability assignments (Dempster's rule) has been given; however, application of this rule, even in simple situations, has been shown to lead to complications [1, 3, 4]. Consequently, Dempster-Shafer theory has not as yet been implemented in expert systems design.

At least two approaches based on fuzzy sets and possibility theory have been implemented in expert systems: certainty factors are used in MYCIN and endorsements are

used in SOLOMON. MYCIN was one of the first rule-based expert systems designed for medical diagnosis [3]; SOLOMON is still in the developmental stage [1]. Certainty factors were developed prior to endorsements, and endorsements can be viewed as an outgrowth of certainty factors; both represent degrees of belief.

A certainty factor is a measure of the confidence that could be placed in any given conclusion as a result of the available evidence; it is defined as the difference between the measure of belief (MB) in the hypothesis given the evidence and the measure of disbelief (MD) in the hypothesis given the same evidence. For example, suppose the measure of belief in the diagnosis (hypothesis) of adenoma, given the observation of a diagnostic clue, is 0.8, while the measure of disbelief in the hypothesis of adenoma, given the observation of the diagnostic clue, is 0.3. Then the certainty factor associated with the hypothesis of adenoma, given observation of the diagnostic clue is

$$\begin{aligned} CF[h:e] &= MB[h:e] - MD[h:e] \\ &= 0.8 - 0.5 \\ &= 0.3 \end{aligned}$$

Measures of belief and measures of disbelief range from 0 to 1. Certainty factors range from -1 (completely false) to +1 (completely true), with zero representing ignorance. Thus the certainty factor represents a balancing of the evidence for and the evidence against the hypothesis. Note that this formulation does not distinguish between conflict of evidence (MB and MD both high) and lack of evidence (MB and MD both low). Note also that neither the certainty factor, the measure of belief, nor the measure of disbelief is a probability. These measures cannot be given any statistical interpretation, but provide a basis for grading hypotheses according to their strength of support.

In combining certainty factors, the operations Min, Max and complementation correspond to "and," "or," and "not," respectively, just as in fuzzy logic. For example, suppose

Rule A: If Diagnostic Clue A observed, then Adenoma  
Rule B: If Diagnostic Clue B observed, then Adenoma

where

$$\begin{aligned} CF(A) &= 0.7 \\ CF(B) &= 0.5 \end{aligned}$$

Then

$$\begin{aligned} CF[\text{Adenoma: A or B observed}] &= \max\{0.7, 0.5\} = 0.7 \\ CF[\text{Adenoma: A and B observed}] &= \min\{0.7, 0.5\} = 0.5 \end{aligned}$$

Shortliffe and Buchanan [3] provide, in addition, an updating formula for combining new information with previous results in a straightforward manner. The updating formula, in terms of certainty factors, is

$$CF[h:e_1, e_2] = CF[h:e_1] + CF[h:e_2] \times [1 - CF[h:e_1]]$$

In the above example,

$$CF[\text{Aden: A, B}] = CF[\text{Aden: A}] + CF[\text{Aden: B}] \times [1 - CF[\text{Aden: A}]]$$

$$= 0.7 + [0.5 \times 0.3] = 0.85$$

or, equivalently

$$= 0.5 + [0.7 \times 0.5] = 0.85$$

Measures of belief and measures of disbelief can be updated in the same way.

This updating formula has two important properties: it is symmetric in the order of  $e_1$  and  $e_2$ , and it moves the certainty factor asymptotically toward one as supporting evidence accumulates. Shortliffe's scheme also provides for the possibility that inference rules, as well as data, may be uncertain; each rule has an associated attenuation, between 0 and 1, which indicates its reliability.

In the model of endorsement, reasons for believing are positive endorsements and reasons for disbelieving are negative endorsements. Cohen [1] uses the analogy of a ledger book to illustrate the method of endorsement. The evidence pro and the evidence con a proposition are arranged in different columns. The accounting is done not by simple addition and subtraction, but on the basis of endorsements of the pieces of evidence. Weighing the evidence thus has two stages: deciding in which column a piece of evidence belongs, and doing the accounting of the evidence pro and con. Endorsements provide the information necessary for these operations. SOLOMON, which is in the early stages of development, is based on the model of endorsement and uses endorsements in reasoning about uncertainty and evidence.

### SUMMARY

Two types of uncertainty must be considered in designing expert systems: probabilistic uncertainty, attributable to randomness, and possibilistic uncertainty, attributable to vagueness or imprecision of linguistic description. Bayes theory and Dempster-Shafer theory have been proposed for modeling probabilistic uncertainty; certainty factors and endorsements have been proposed for representing possibilistic uncertainty. Bayes theory and certainty factors have thus far been implemented in expert systems.

This study has been supported in part by a grant from the National Institutes of Health, 1 P01-CA 38548 (PHB), and in part by grant NIH SAG1 R 35-CA 42517 (GLW).

### REFERENCES

1. Cohen, P. H., (1985). *Heuristic Reasoning about Uncertainty: An Artificial Intelligence Approach*. Pitman Publishing, Inc., Marshfield, Massachusetts.
2. Zadeh, L. A., (1978). *Fuzzy Sets as a Basis for a Theory of Possibility in Fuzzy Sets and Systems*. North-Holland, New Amsterdam.
3. Buchanan, B. G., and Shortliffe, E. H., (1984). *Rule-based Expert Systems: the MYCIN Experiments of the Stanford Heuristic Programming Project*. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts.
4. Shafer, G., (1976). *A Mathematical Theory of Evidence*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

**BEST AVAILABLE COPY**